



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας:

**«Μεταλλάξεις του υποκινητή της τελομεράσης στον
καρκίνο του θυρεοειδούς στον Ελληνικό πληθυσμό»**



GUMBINGER ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ-ΤΗΛΕΜΑΧΟΣ-ΚΩΣΤΑΣ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: ΛΙΑΔΑΚΗ ΚΑΛΛΙΟΠΗ

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας

ΛΑΡΙΣΑ 2018



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας:

**«Μεταλλάξεις του υποκινητή της τελομεράσης στον
καρκίνο του θυρεοειδούς στον Ελληνικό πληθυσμό»**

**«TERT PROMOTER MUTATIONS IN THYROID CANCER IN
THE GREEK POPULATION»**



GUMBINGER ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ-ΤΗΛΕΜΑΧΟΣ-ΚΩΣΤΑΣ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: ΛΙΑΔΑΚΗ ΚΑΛΛΙΟΠΗ

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας

ΛΑΡΙΣΑ 2018

Υπεύθυνη καθηγήτρια: **Λιαδάκη Καλλιόπη**, Επίκουρη Καθηγήτρια TBB, Π.Θ.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αντικείμενο μελέτης της είναι η μοριακή ανάλυση του γονιδίου TERT σε διάφορους τύπους καρκινωμάτων του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω πρωτίστως την κυρία Λιαδάκη Καλλιόπη, επίκουρη καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, αρχικά για την ανάθεση της παρούσας εργασίας, αλλά κυρίως και για την εμπιστοσύνη και την καθοδήγηση που μου παρείχε για την καλύτερη βελτίωση του κειμένου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη του εργαστηρίου της Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την φιλοξενία αλλά και το εργαστήριο Γενετική, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για την παροχή απαραίτητου εξοπλισμού για την εργασία καθώς και για την δυνατότητα ανάπτυξης φιλίας με εξαιρετικούς ανθρώπους.

Γκούμπινγκερ Αλεξάντερ-Τηλέμαχος-Κώστας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	6
Abstract	7
1. Εισαγωγή	8
1.1. Θυρεοειδής αδένας	8
1.1.1. Ανατομία θυρεοειδούς αδένα.....	8
1.1.2. Φυσιολογία του θυρεοειδούς αδένα	9
1.1.2.1. Θυρεοειδής ορμόνες	10
1.1.2.2. Παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών	10
1.1.2.3. Φυσιολογική λειτουργία του θυρεοειδούς	10
1.1.2.4. Ρύθμιση της λειτουργίας του θυρεοειδούς αδένα	11
1.1.3. Συχνότερες διαταραχές του θυρεοειδούς αδένα	12
1.2. Καρκίνος του θυρεοειδούς αδένα	12
1.2.1. Γενικά	12
1.2.2. Ιστολογική ταξινόμηση	13
1.2.2.1. Θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς	14
1.2.2.2. Θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς	15
1.2.2.3. Μυελώδης καρκίνος του θυρεοειδούς	16
1.2.2.4. Αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς	17
1.2.2.5. Διάγνωση και θεραπεία του θυρεοειδούς καρκίνου	18
1.3. Σηματοδοτικό μονοπάτι των RAS-MAPK	19
1.3.1. Πρωτεΐνες RAS	21
1.3.2. Πρωτεΐνες BRAF	21
1.4. Μοριακή διάγνωση του καρκίνου	22
1.4.1. Γενικά	22
1.4.2. Μεταλλάξεις BRAF	22
1.4.3. Μεταλλάξεις RAS	23
1.4.4. Αναδιατάξεις RET-PTC	24
1.4.5. Αναδιατάξεις PAX8-PPARc	24
1.4.6. Αντίστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης(TERT)	25
1.4.6.1. Τελομερή και τελομεράση	25
1.4.6.2. Το γονίδιο TERT	26
1.4.6.3. Μεταλλάξεις TERT στο καρκίνο	26
1.4.6.4. Μεταλλάξεις TERT στον καρκίνο του θυρεοειδούς	28

2. Υλικά και μέθοδοι	30
2.1. Υλικά	30
2.1.1. Δείγματα	30
2.2. Μέθοδοι	30
2.2.1. Απομόνωση DNA από βιοψίες ιστών	30
2.2.1.1. Αντιδραστήρια – Διαλύματα	30
2.2.1.2. Πρωτόκολλο απομόνωσης	31
2.2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	32
2.2.2.1. Αντιδραστήρια – Διαλύματα	32
2.2.2.2. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης	33
2.2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση τελομεράσης	35
2.2.4. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR	40
2.2.5. Αλληλούχιση των καθαρισμένων προϊόντων της PCR	41
3. Αποτελέσματα	42
3.1. Ενίσχυση της υπό μελέτη περιοχής του γονιδίου TERT με τηPCR	42
3.2. Καθαρισμός προϊόντων της PCR	42
3.3. Αλληλούχιση προϊόντων της PCR	43
3.4. Συζήτηση	44
Βιβλιογραφία	46

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί την πιο κοινή ενδοκρινή κακοήθεια και η συχνότητά του αυξάνεται ταχύτατα παγκοσμίως τις τελευταίες δεκαετίες. Διακρίνεται σε ποικίλους ιστολογικούς τύπους οι οποίοι παρουσιάζουν διαφορετική κυτταρική προέλευση, χαρακτηριστικά, πρόγνωση, ικανότητα μετάστασης και θνησιμότητα. Προηγούμενες μελέτες έχουν ταυτοποιήσει γενετικές μεταλλάξεις που σχετίζονται με την παθογένεση των διαφόρων τύπων καρκίνου του θυρεοειδούς. Σε αυτές περιλαμβάνονται μεταλλάξεις των γονιδίων BRAF και RAS (HRAS, NRAS, KRAS), γενετικές αναδιατάξεις όπως RET/PTC και PAX8/PPARγ και οι μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου της τελομεράσης (TERT). Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η ύπαρξη συγκεκριμένων μεταλλάξεων στο γονίδιο της TERT (C250T, C243T, C242T, C228T) σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό. Μελετήθηκαν συνολικά 34 δείγματα ασθενών στους οποίους περιλαμβάνονται 15 ιστοί με θηλώδες καρκίνωμα, 13 ιστοί με θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδους υποτύπου, 4 ιστοί με θυλακιώδες καρκίνωμα και 2 ιστοί με μυελοειδές καρκίνωμα. Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε την απομόνωση γενωμικού DNA από τις βιοψίες ιστών εγκλεισμένων σε παραφίνη, την ενίσχυση των ειδικών περιοχών του γονιδίου με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR και την αλληλούχιση τους. Στη συγκεκριμένη μελέτη ταυτοποιήθηκε η μετάλλαξη C228T σε ένα δείγμα, ενώ οι μεταλλάξεις C250T και C243T C242T δεν ταυτοποιήθηκαν σε κανένα από τα δείγματα που εξετάστηκαν. Η μετάλλαξη C228T ταυτοποιήθηκε σε θηλώδες καρκίνωμα μίας ασθενούς και συνυπάρχει με την μετάλλαξη του γονιδίου BRAF. Λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, κρίνεται απαραίτητο η μελέτη να επεκταθεί ώστε να περιλαμβάνει μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

ABSTRACT

Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy and its frequency is growing rapidly worldwide over the last decades. It is distinguished in many histological types which have different cellular origin, characteristics, prognosis, metastatic behavior and mortality. Previous studies have identified genetic alterations which result in the pathogenesis of various types of thyroid cancer. These include mutations of the BRAF and RAS (HRAS, NRAS, KRAS) genes, genetic rearrangements, such as RET/PTC and PAX8/PPAR γ , as well as the recently identified mutations in the promoter of the TERT gene. The purpose of this study is to investigate the presence of specific mutations on the TERT gene (C250T, C243T, C242T, C228T) in different cancer types in the Greek population. Overall, 34 samples derived from patients with thyroid cancer were examined, which include 15 papillary carcinomas, 13 follicular variants of papillary carcinomas, 4 follicular carcinomas and 2 medullary carcinomas. The experimental procedure included the isolation of genomic DNA from paraffin-embedded tissue biopsies, amplification of the specific region of interest using Polymerase Chain Reaction (PCR), the purification of the amplified DNA followed by sequencing of the PCR products. We identified the C228T mutation in one sample, but no C250T, C243T and C242T mutations were found in all the examined samples. The C228T mutation was found in a tumor of a female patient with papillary carcinoma. Furthermore, this mutation coexisted with the BRAF V600E mutation. In conclusion, the present study must be extended in a larger sample population, in order to draw safe conclusions regarding the frequency of TERT promoter mutations in thyroid cancer in the Greek population.

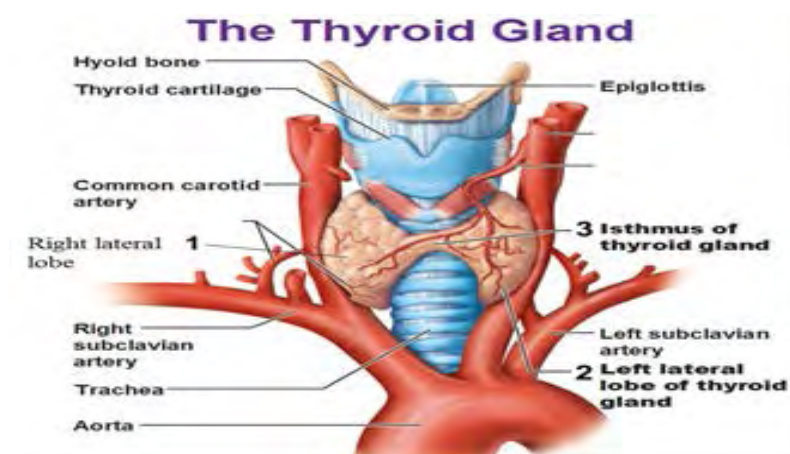
1. Εισαγωγή

1.1. Θυρεοειδής αδένας

Ο θυρεοειδής αδένας βρίσκεται αμέσως κάτω από τον λάρυγγα, εκατέρωθεν και μπροστά από την τραχεία και είναι ένας από τους μεγαλύτερους αδένες του σώματος. Ζυγίζει 15 έως 20 gr στους ενήλικες και εκκρίνει δύο από τις σημαντικές ορμόνες τη θυροξίνη (T4) και τη τριιωδοθυρονίνη (T3), οι οποίες εξασκούν ισχυρή επίδραση στην αύξηση του μεταβολικού ρυθμού του σώματος. Ο θυρεοειδής αδένας εκκρίνει επίσης και την καλσιτονίνη, μια σημαντική ορμόνη για τον μεταβολισμό του ασβεστίου (Guyton & Hall, 2016).

1.1.1. Ανατομία θυρεοειδούς αδένος

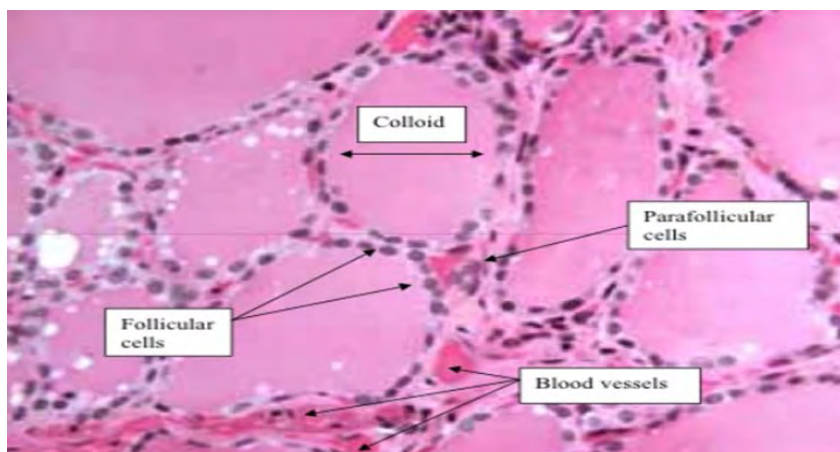
Ο θυρεοειδής είναι ένας ενδοκρινής αδένας που έχει σχήμα θυρεού (ασπίδας) και βρίσκεται στο κάτω τμήμα της πρόσθιας μοίρας του τραχήλου σε επαφή με το άνω μέρος της τραχείας. Αποτελείται από δύο λοβούς που βρίσκονται δεξιά και αριστερά της τραχείας οι οποίοι συνδέονται με μία λωρίδα ιστού, που καλείται ισθμός, και περιβάλλονται από μία κάψα συνδετικού ιστού η οποία προέρχεται από την τραχηλική περιτονία. Οι ενήλικες τυπικά έχουν τέσσερις μικρούς στρογγυλούς παραθυρεοειδούς αδένες, ο καθένας με μέγεθος 3 – 6 χιλιοστά, που επικάθονται στην οπίσθια επιφάνεια του θυρεοειδούς, κοντά στον διχασμό των άνω και κάτω θυρεοειδών αρτηριών που τους παρέχουν πλούσια αγγείωση. Διαχωρίζονται από τον θυρεοειδή με μία λεπτή κάψα ινώδους συνδετικού ιστού που περιβάλλει κάθε αδένος (Ovalle & Nahirney 2011) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1 : Ανατομία του θυρεοειδούς αδένος: 1 Δεξιός λοβός, 2 Αριστερός λοβός, 3 Ισθμός.

Ο θυρεοειδής αδένας αποτελείται από μεγάλο αριθμό κλειστών θυλακίων (thyroid follicles), που είναι γεμάτα με έκκριμα που ονομάζεται κολλοειδές, ενώ το τοίχωμά τους επενδύεται από κυβοειδή επιθηλιακά κύτταρα, που εκκρίνουν προς το εσωτερικό των θυλακίων. Το μεγαλύτερο μέρος από τα συστατικά του κολλοειδούς είναι η γλυκοπρωτεΐνη θυρεοσφαιρίνη, στο μόριο της οποίας εμπεριέχονται οι ορμόνες του θυρεοειδούς (Guyton & Hall, 2016). Ο χώρος ανάμεσα στα θυλάκια καταλαμβάνεται από συνδετικό ιστό και αποτελείται από δύο τύπους επιθηλιακών

κυττάρων: τα θυλακιώδη (follicular) κύτταρα και τα παραθυλακιώδη (parafollicular) κύτταρα ή κύτταρα C (Scopa et al., 2004) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Ιστολογία του θυρεοειδούς: κολλοειδές (Colloid), θυλακιώδη κύτταρα (follicular), παραθυλακιώδη κύτταρα (parafollicular) ή κύτταρα C, αιμοφόρο αγγείο (blood vessel).

1.1.2. Φυσιολογία του θυρεοειδούς αδένος

1.1.2.1. Θυρεοειδείς ορμόνες

Το ιώδιο βρίσκεται στο επίκεντρο της λειτουργίας του θυρεοειδούς. Η καθημερινή ανάγκη του ανθρώπου σε ιώδιο ανέρχεται σε 75 μέχρι 150 μg , το οποίο προσλαμβάνεται από το λεπτό έντερο ως ιόντα ιωδίου μέσω της τροφής, το νερό και γενικότερα από το περιβάλλον και χρησιμοποιείται για την σύνθεση των δύο βασικών ορμονών του θυρεοειδούς, δηλαδή της τριιωδοθυρονίνης (T3) και της θυροξίνης (T4) (Κουτσαμπέλας, 1986). Και οι δύο ορμόνες ασκούν ισχυρή επίδραση στην αύξηση του μεταβολικού ρυθμού του σώματος. Η παντελής έλλειψη της έκκρισης από τον θυρεοειδή συνεπάγεται συνήθως ελάττωση του βασικού μεταβολικού ρυθμού κατά 40 έως 50% περίπου κάτω από το φυσιολογικό επίπεδο, ενώ κατά τη μέγιστη υπέρμετρη αύξηση της έκκρισης ο βασικός μεταβολισμός του ατόμου μπορεί να αυξάνεται κατά 60 έως 100% πάνω από το φυσιολογικό επίπεδο (Guyton & Hall, 2016). Ο θυρεοειδής αδένος αποταμιεύει ιώδιο τουλάχιστον για 2 έως 3 μήνες. Η μέση ποσότητα ιωδίου ενός φυσιολογικού σε βάρος θυρεοειδούς ανέρχεται σε 10 μέχρι 20 mg, που αντιστοιχεί στο 80 – 90% ολόκληρου του σώματος (Κουτσαμπέλας, 1986). Η έκκριση από τον θυρεοειδή αδένος ελέγχεται κυρίως από τη θυρεοειδοτρόπο ορμόνη (TSH) που εκκρίνεται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Τα παραθυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς εκκρίνουν την καλσιτονίνη, μία ορμόνη που εμπλέκεται στον μεταβολισμό του ασβεστίου (Guyton & Hall, 2016).

1.1.2.2. Παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών

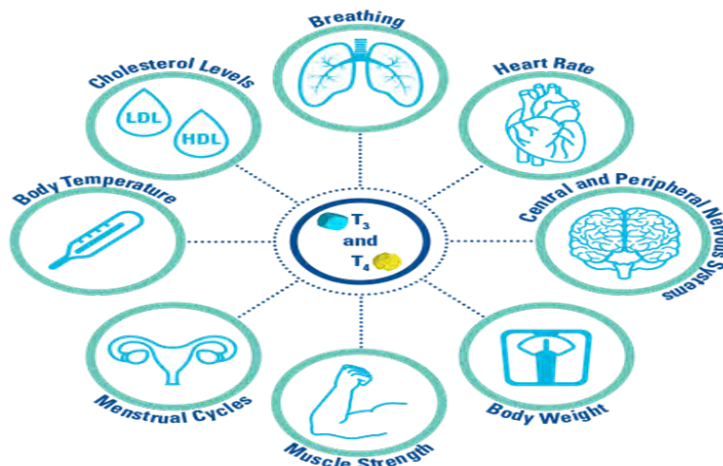
Η σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών λαμβάνει χώρα στα κύτταρα της θυρεοσφαιρίνης μέσα στο κολλοειδές και είναι μία αρκετά πολύπλοκη διαδικασία που εξαρτάται από την παρουσία ιωδίου και τυροσίνης (Kirsten, 2000). Τα κύτταρα του θυρεοειδούς αδένος είναι τυπικά αδενικά κύτταρα που εκκρίνουν πρωτεΐνη. Το ενδοπλασματικό δίκτυο και η συσκευή Golgi συνθέτουν και εκκρίνουν προς τα θυλάκια του αδένος μια μεγαλομοριακή γλυκοπρωτεΐνη, η οποία ονομάζεται θυρεοσφαιρίνη (Guyton & Hall, 2016). Η τυροσίνη είναι ένα αμινοξύ το οποίο συντίθεται σε επαρκή ποσότητα και είναι το κύριο υπόστρωμα για την σύζευξη του ιωδίου έτσι ώστε να σχηματιστούν οι θυρεοειδικές ορμόνες. Σε αντίθεση με την τυροσίνη, το ιώδιο λαμβάνεται εξωγενώς είτε με την διατροφή, είτε μέσω του δέρματος και των πνευμόνων (Kirsten, 2000).

Το πρώτο ουσιαστικό βήμα για τον σχηματισμό των ορμονών του θυρεοειδούς συνίσταται στην μετατροπή των ιόντων ιωδιδίου σε οξειδωμένη μορφή ιωδίου, που στην συνέχεια θα μπορέσει να συνδεθεί άμεσα με το αμινοξύ τυροσίνη. Αυτή η οξείδωση του ιωδίου προάγεται από το ένζυμο υπεροξειδάση και το συνοδό υπεροξειδίο του υδρογόνου, τα οποία παρέχουν δραστικό σύστημα που διαθέτει την ικανότητα για την οξείδωση ιωδιδίων (Guyton & Hall, 2016). Όταν αυτό επιτευχθεί, και το ιώδιο συνδεθεί με τη τυροσίνη στο μόριο της θυρεοσφαιρίνης, σχηματίζονται δύο ιωδοτυροσίνες: η μονοϊωδοτυροσίνη (MIT) και η διωδοτυροσίνη (DIT). Μετά από μερικά λεπτά, ώρες ή και ημέρες με την διαδικασία της σύζευξης, οι ιωδοτυροσίνες σε συνδυασμό μεταξύ τους σχηματίζουν τις ιωδοθυρονίνες, που δύο από αυτές είναι η T3 και T4 (Denise Kirsten, 2000). Η T4 σχηματίζεται όταν συνδέονται δύο μόρια διωδοτυροσίνης στη διαδικασία της σύζευξης, ενώ η T3 σχηματίζεται όταν συνδέεται ένα μόριο μονοϊωδοτυροσίνης με ένα μόριο διωδοτυροσίνης. Μικρές ποσότητες αντίστροφης T3 (RT3) σχηματίζονται από την σύνδεση διωδοτυροσίνης με μονοϊωδοτυροσίνη, αλλά η RT3 δεν φαίνεται να έχει κάποια λειτουργική σημασία στους ανθρώπους (Guyton & Hall, 2016).

1.1.2.3. Φυσιολογική λειτουργία του θυρεοειδούς

Η γενική επίδραση των ορμονών του θυρεοειδούς είναι η πραγματοποίηση μεταγραφής μεγάλου αριθμού γονιδίων. Κατά συνέπεια, ουσιαστικά σε όλα τα κύτταρα του σώματος, συντίθεται μεγάλος αριθμός πρωτεϊνικών ενζύμων, δομικών πρωτεϊνών, μεταφορικών πρωτεϊνών και άλλων ουσιών. Το τελικό αποτέλεσμα όλων αυτών είναι μία γενικευμένη αύξηση της λειτουργικής δραστηριότητας σε ολόκληρο το σώμα (Guyton & Hall, 2016).

Οι κύριες δράσεις των θυρεοειδικών ορμονών είναι η ρύθμιση της κατανάλωσης οξυγόνου και η ρύθμιση του μεταβολισμού των πρωτεϊνών, υδατανθράκων και λιπών. Επίσης, ρυθμίζουν την σύνθεση και αποικοδόμηση πολλών άλλων ορμονών. Εκτός από τις παραπάνω δράσεις, οι ορμόνες T3 και T4 επιδρούν στο νευρικό αλλά και στο αναπαραγωγικό σύστημα (Kirsten, 2000) (Εικόνα 3).

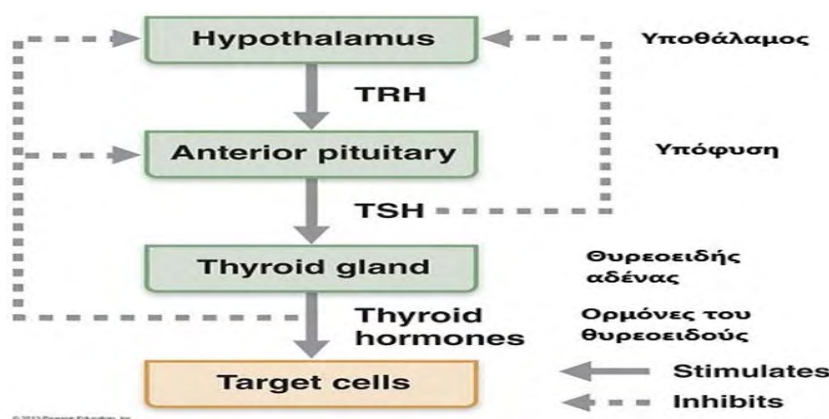


Εικόνα 3: Επιδράσεις των ορμονών T3 και T4 στον οργανισμό.

1.1.2.4. Ρύθμιση της λειτουργίας του θυρεοειδούς αδένος

Ο κύριος ρυθμιστής της σύνθεσης και έκκρισης των θυρεοειδικών ορμονών είναι η TSH (θυρεοειδοτρόπος ορμόνη), μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 28.000 kDa, η οποία εκκρίνεται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Η έκκριση των θυρεοειδικών ορμονών ρυθμίζεται από μία διαδικασία ανατροφοδότησης όπου παίρνει μέρος ο υποθάλαμος, ο πρόσθιος λοβός της υπόφυσης και ο θυρεοειδής αδένος. Η εναρκτήρια ορμόνη της διαδικασίας είναι η θυρεοτροπίνη (TRH), η οποία συντίθεται και αποθηκεύεται στον υποθάλαμο.

Όταν τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών στον ορό πέφτουν τότε απελευθερώνεται η TRH μέσα στο σύστημα HPT (πυλαίο σύστημα υποθάλαμου-υπόφυσης-θυρεοειδής αδένος) και κατευθύνεται προς το πρόσθιο λοβό της υπόφυσης ώστε να διεγείρει την έκκριση της TSH. Η απελευθέρωση της TSH από την υπόφυση διεγείρει τον θυρεοειδή αδένος ώστε να παράξει τις θυρεοειδικές ορμόνες και να τις απελευθερώσει στην κυκλοφορία. Αντιθέτως, η αύξηση των ορμονών του θυρεοειδούς αδένος στα υγρά του σώματος προκαλεί ελάττωση της TSH (Yen, 2001) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Ρύθμιση της έκκρισης των ορμονών του θυρεοειδούς.

1.1.3. Συχνότερες διαταραχές του θυρεοειδούς αδένος

Η δυσλειτουργία του θυρεοειδούς αποτελεί μία από τις πιο συχνές ενδοκρινικές διαταραχές και απαντάται σε ποσοστό >10% του γενικού πληθυσμού με τις γυναίκες να είναι πιο επιρρεπείς σε σχέση με τους άνδρες. Οι συχνότερες διαταραχές του θυρεοειδούς αδένος είναι η ανεπαρκής έκκριση ή δράση των θυρεοειδικών ορμονών (υποθυρεοειδισμός) και η υπέρμετρη παραγωγή ή απελευθέρωση θυρεοειδικών ορμονών (υπερθυρεοειδισμός). Η πιο συχνή αιτία των διαταραχών αυτών είναι η θυρεοειδική αυτονοσία. Στους περισσότερους ασθενείς με υπερθυρεοειδισμό, ολόκληρος ο θυρεοειδής αδένος αυξάνεται σε μέγεθος κατά δύο έως τρεις φορές πέρα από το φυσιολογικό, με μεγάλη υπερπλασία και πτύχωση της εσωτερικής επένδυσης των θυλακίων κατά τρόπο ώστε ο αριθμός των κυττάρων να αυξάνεται στο πολλαπλάσιο. Επίσης, ο ρυθμός έκκρισης από κάθε κύτταρο αυξάνεται στο πολλαπλάσιο (5 έως 15 φορές) του φυσιολογικού. Στον υποθυρεοειδισμό, οι επιδράσεις του είναι γενικά αντίθετες του υπερθυρεοειδισμού, αλλά πρέπει να αναφερθεί ότι ορισμένοι μηχανισμοί είναι χαρακτηριστικοί για τον υποθυρεοειδισμό. Ο υποθυρεοειδισμός όπως και ο υπερθυρεοειδισμός, πιθανώς οφείλεται στις περισσότερες περιπτώσεις σε αυτονοσία έναντι του θυρεοειδούς αδένος, αλλά σε αυτή την περίπτωση η αυτονοσία καταστρέφει μάλλον παρά διεγείρει τον αδένος. Ο θυρεοειδής αδένος στους περισσότερους από τους ασθενείς αυτούς εμφανίζει φλεγμονή (θυρεοειδίτιδα). Λόγω της φλεγμονής προκαλείται προοδευτική εκφύλιση και τελικά ίνωση του αδένος, με επακόλουθη μείωση ή και πλήρη απουσία της έκκρισης των θυρεοειδικών ορμονών (Guyton & Hall, 2016).

1.2. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

1.2.1. Γενικά

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένος αποτελεί τον πιο κοινό τύπο κακοήθειας του ενδοκρινούς συστήματος και η συχνότητα εμφάνισης είναι σταθερά αυξανόμενη σε όλες τις χώρες (Nikiforov, 2011). Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αντιπροσωπεύει το 1% του συνόλου όλων των περιπτώσεων καρκίνου στις αναπτυγμένες χώρες. Επηρεάζει όλες τις ηλικίες, αν και είναι πιο σπάνιος στα παιδιά και σύμφωνα με μελέτες εμφανίζεται πιο συχνά στις γυναίκες από ότι στους άνδρες. Η συνεχόμενη αύξηση

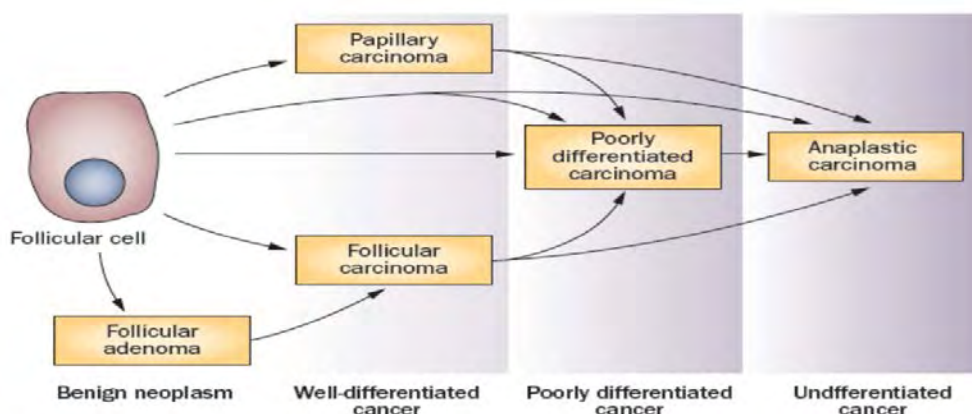
των περιπτώσεων με καρκίνο του θυρεοειδούς αδένα πιθανώς να οφείλεται στην αύξηση της παρακολούθησης των ασθενών, στις όλο και πιο διαδεδομένες τεχνικές διάγνωσης σε ασυμπτωματικά θυρεοειδικά οζίδια, στην αλλαγή δημογραφικών στοιχείων και στους μεταβαλλόμενους περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου (Altekruse et al, 2010). Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένα παρουσιάζεται με την μορφή μονήρους όζου, δηλαδή, ως μία τοπική διόγκωση, ο οποίος μπορεί να παρουσιαστεί ως ψηλαφητή μάζα στον τράχηλο. Η εξέταση με υπερηχογράφημα ασυμπτωματικών ασθενών δείχνει ότι το 50-70% έχουν όζο, λιγότερο από το 5% αυτών έχουν κακοήθεια, ενώ οι περισσότεροι έχουν κύστες (Liebner and Shah, 2011).

Ο κύριος στόχος στη διαχείριση των ασθενών με όζους του θυρεοειδούς είναι η διάκριση των κακοήθων από τα καλοήγη οζίδια. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιούνται λήψη του ιστορικού και σωματική εξέταση του ασθενούς και περαιτέρω εργαστηριακές μελέτες. Το υπερηχογράφημα παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των όζων και την πιθανή συμμετοχή των τραχηλικών λεμφαδένων. Η παρακέντηση με λεπτή βελόνα (Fine needle aspiration, FNA) δίνει κυτταρολογικά αποτελέσματα, τα οποία επηρεάζουν άμεσα την διάγνωση. Σύμφωνα με τα κυτταρολογικά ευρήματα τα οζίδια μπορούν να ταξινομηθούν ως καλοήγη (περίπου 70%), ύποπτα (περίπου 10%), κακοήγη (περίπου 5%) ή ως μη διαγνωστικά (περίπου 15%). Η διαγνωστική ακρίβεια της FNA είναι κοντά στο 98%, με την αναλογία των ψευδών θετικών και ψευδών αρνητικών αποτελεσμάτων να είναι μικρότερη του 2% (Filetti et al, 2006).

1.2.2. Ιστολογική ταξινόμηση

Σύμφωνα με την ιστολογική ταξινόμηση τα θυρεοειδικά νεοπλάσματα ποικίλουν ιστολογικά, κυτταρολογικά και ως προς την μοριακή διαφοροποίησή τους. Οι όγκοι του καρκίνου του θυρεοειδούς προέρχονται από τα θυλακιώδη επιθηλιακά κύτταρα, από τα παραθυλακιώδη κύτταρα καθώς και από μη επιθηλιακά στοιχεία του στρώματος (Scopa, 2004). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health organization, WHO), οι πρωτοπαθείς όγκοι του θυρεοειδούς ταξινομούνται σε επιθηλιακούς και μη επιθηλιακούς, καλοήθεις ή κακοήθεις. Σε μία ξεχωριστή κατηγορία κατατάσσονται τα λεμφώματα και τα διάφορα νεοπλάσματα καθώς και οι δευτεροπαθείς ή μεταστατικοί όγκοι του θυρεοειδούς αδένα, οι οποίοι είναι πιο σπάνιοι (Scopa, 2004). Οι περισσότεροι τύποι καρκίνου του θυρεοειδούς προέρχονται από τα θυλακιώδη κύτταρα. Το θηλώδες καρκίνωμα είναι ο πιο συχνός τύπος καρκίνου (με συχνότητα περίπου 80%) και ακολουθεί το θυλακιώδες (follicular) καρκίνωμα με συχνότητα περίπου 15% (Nikiforov, 2011).

Τα χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα και τα αναπλαστικά καρκινώματα προέρχονται, επίσης, από τα θυλακιώδη κύτταρα, αλλά θεωρείται ότι αναπτύσσονται ως αποτέλεσμα της αποδιαφοροποίησης των υψηλής-διαφοροποίησης θηλωδών ή θυλακιωδών καρκινωμάτων (Εικόνα 5) (Nikiforov and Nikiforova, 2011). Τέλος, ο μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς προέρχεται από τα παραθυλακιώδη κύτταρα ή κύτταρα C και υπολογίζεται ότι αποτελεί περίπου το 3% όλων των καρκίνων του θυρεοειδούς (Nikiforov, 2011).



Εικόνα 5: Σχέδιο της δημιουργίας των διαφορετικών όγκων του θυρεοειδούς που προέρχεται από τα θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς.

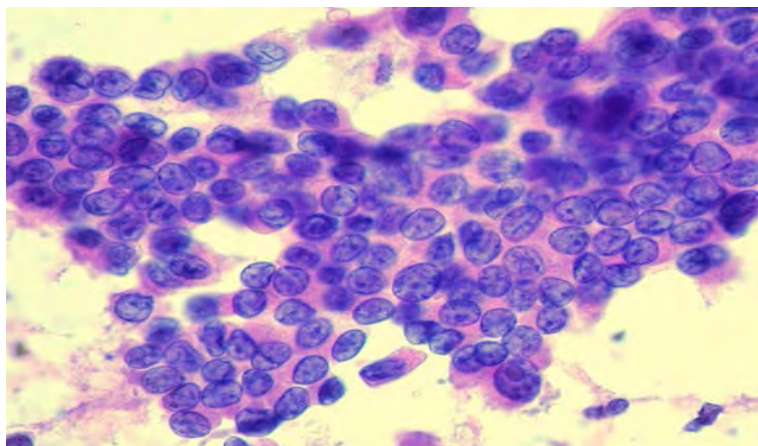
1.2.2.1. Θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς

Ο πιο συχνός κακοήθης όγκος του θυρεοειδούς αδένου είναι το θηλώδες καρκίνωμα (Livolsi et al, 2004) (Εικόνα 6). Χαρακτηριζόμενος κλασικά από την θηλώδη εμφάνισή του, το θηλώδες θυρεοειδικό καρκίνωμα (Papillary Thyroid Carcinoma, PTC) υπολογίζεται ότι αποτελεί το 80% όλων των καρκίνων του θυρεοειδούς (Sak, 2015). Το PTC αντιπροσωπεύει επίσης την πιο συχνή παιδιατρική κακοήθεια παρά το γεγονός ότι ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι ασυνήθιστος στην παιδική ηλικία. Οι περισσότερες περιπτώσεις με θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς στους ενήλικους εμφανίζονται σε ασθενείς ηλικίας μεταξύ 20 – 50 χρονών, με αναλογία 4 – 5 : 1 των γυναικών έναντι των ανδρών (Delellis, 2006). Το μέγεθος του θηλώδους καρκινώματος είναι εξαιρετικά ποικίλο με μέση διάμετρο 2 – 3 cm² (Scopa, 2004).

Πολλές παραλλαγές του θηλώδους καρκινώματος έχουν περιγραφεί λαμβάνοντας υπόψη το μέγεθος (papillary microcarcinoma), την φύση των ορίων του όγκου (encapsulated), την αρχιτεκτονική του (follicular, macrofollicular, cribriform-morular, solid, micropapillary), τα κυτταρικά χαρακτηριστικά (tall cell, columnar, oncocytic, clear cell, hobnail), τα επιπλέον συστατικά του όγκου (papillary carcinoma with focal insular component), τα χαρακτηριστικά του στρώματος (papillary carcinoma with fasciitis like stroma), ή με κάποιον συνδυασμό από τα αναφερόμενα ανωτέρω χαρακτηριστικά (diffuse sclerosing, diffuse follicular) (Sak, 2015). Το συμβατικό θηλώδες καρκίνωμα (conventional PTC) του θυρεοειδούς χαρακτηρίζεται από μία

σύνθετη διακλαδιζόμενη αρχιτεκτονική στην οποία οι επιφάνειες των πυρήνων καλύπτονται από νεοπλασματικά κύτταρα, και είναι συνήθεις διάφοροι βαθμοί πλακώδους μεταπλασίας (Delellis, 2006).

Τέλος, ο θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς έχει την καλύτερη συνολική πρόγνωση. Οι μεταστάσεις του αφορούν συχνότερα τους τραχηλικούς λεμφαδένες και λιγότερο τους πνεύμονες (Cabanillas et al., 2016).



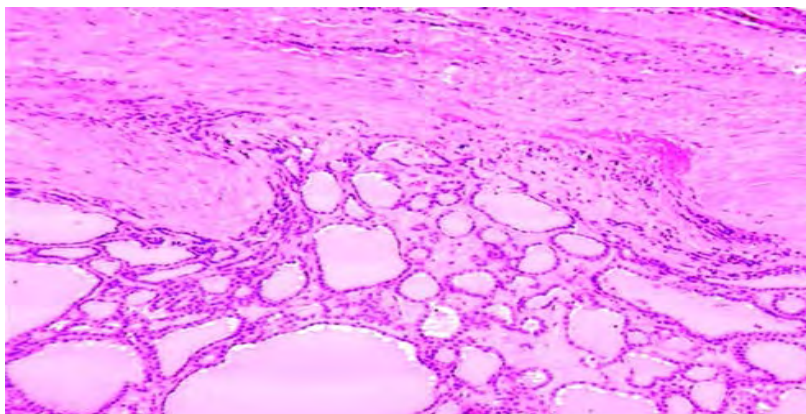
Εικόνα 6: Θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς.

1.2.2.2. Θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς

Το θυλακιώδες καρκίνωμα (Follicular Thyroid carcinoma, FTC) χαρακτηρίστηκε έτσι λόγω της συχνής παρατήρησης μικρών θυλακιωδών σχηματισμών, όπως ακριβώς στις θηλώδεις εκδηλώσεις που χαρακτηρίζουν το θηλώδες καρκίνωμα (Beahrs, 1969) (Εικόνα 7). Ανάλογα από τον βαθμό διήθησης, το θυλακιώδες καρκίνωμα έχει χωριστεί σε δύο μεγάλες κατηγορίες: σε καρκίνους με ελάχιστη διήθηση και σε καρκίνους με ευρεία διήθηση. Η συχνότητα εμφάνισης του θυλακιώδους καρκίνου σε σχέση με τις άλλες κακοήθειες του θυρεοειδούς κυμαίνεται από 5 -10% σε περιοχές που δεν υπάρχει ανεπάρκεια σε ιώδιο και 30 – 40% σε ιωδοπενικές περιοχές (Scopa, 2004).

Μακροσκοπικά, το θυλακιώδες καρκίνωμα δεν διαφέρει σημαντικά από το θυλακιώδες αδένωμα. Η ινώδης κάψουλα που περιβάλλει τον όγκο τείνει να είναι παχύτερη και πιο ακανόνιστη από ότι στο αδένωμα. Στο θυλακιώδες καρκίνωμα με την ελάχιστη διήθηση, εκτιμάται η ύπαρξη διήθησης στην κάψα ή/και στα αγγεία μόνο με μικροσκοπική αξιολόγηση, ενώ στο νεόπλασμα με την ευρεία διήθηση υπάρχει έλλειψη εγκλεισμού του μέσα στην κάψα που το περιβάλλει καθώς και εκτενής διήθηση στον περιβάλλοντα θυρεοειδικό ιστό και/ή ευρεία διείσδυση του στα αιμοφόρα αγγεία (Scopa, 2004). Το θυλακιώδες καρκίνωμα είναι ένας υψηλού κινδύνου καρκίνος ο οποίος έχει την τάση να δίνει αιματογενώς απομακρυσμένες μεταστάσεις, κυρίως στους πνεύμονες και στα οστά (Cabanillas et al., 2016). Οι θυλακιώδεις όγκοι του θυρεοειδούς υποδιαιρούνται στον συμβατικό καρκίνο (conventional FTC) και στον ογκοκυττικό καρκίνο (Hürthle type) (Nikiforov, 2011).

Η προεγχειρητική διάγνωση των θυλακιωδών όγκων είναι αρκετά δύσκολη επειδή τα αδενώματα και τα καρκινώματα μοιράζονται παρόμοια κυτταρολογικά χαρακτηριστικά (Nikiforova et al., 2003). Ακόμη και με παρακέντηση με λεπτή βελόνα (FNA) δεν μπορούν να διαγνωστούν επακριβώς, δεδομένου ότι τα κρίσιμα διαγνωστικά κριτήρια απουσιάζουν, για αυτό τον λόγο συμπεριλαμβάνεται εκτός της βιοψίας με FNA και υπέρηχος (Cabanillas et al., 2016).



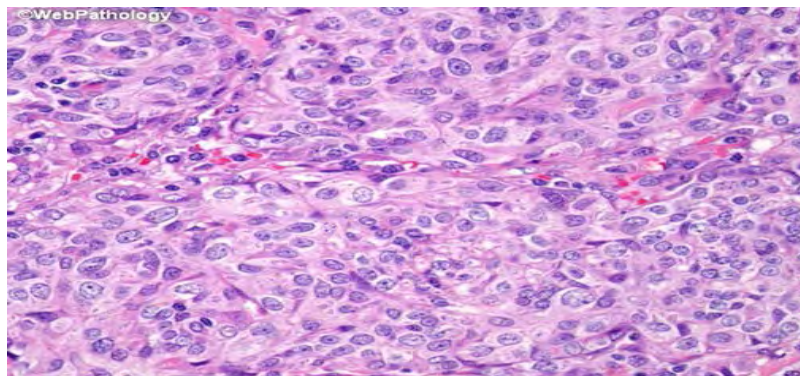
Εικόνα 7: Θυλακίωδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς.

1.2.2.3. Μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς

Ο μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς (Myeloid Thyroid Carcinoma, MTC) είναι ένας κακοήθης όγκος ο οποίος προέρχεται από τα παραθυλακίωδη ή κύτταρα C, τα οποία σε φυσιολογικές συνθήκες εκκρίνουν την ορμόνη καλσιτονίνη. Ο MTC υπολογίζεται ότι αποτελεί το <5% των καρκίνων του θυρεοειδούς (Trimboli et al., 2013).

Ο MTC συνήθως εντοπίζεται ανάμεσα στο πάνω τρίτο και δύο τρίτα του κάτω λοβού του θυρεοειδούς και είναι σταθερός, άλλοτε έχει κόκκινο χρώμα ή είναι υπόλευκος. Από ιστολογικής σκοπιάς, το μυελοειδές καρκίνωμα συνίσταται από φύλλα σχήματος ατράκτου, κυκλικά ή πολυγωνικά κύτταρα, τα οποία διαχωρίζονται από ένα ινώδες στρώμα. Οι πυρήνες έχουν συνήθως ομοιόμορφο σχήμα και σπάνια παρουσιάζουν μιτωτικές μορφές. Τέλος, το κυτταρόπλασμα είναι εωσινόφιλο με απαλές γκρι εμφανίσεις ενώ παρατηρούνται εναποθέσεις αμυλοειδούς μεταξύ των καρκινικών κυττάρων στο 75% των όγκων (Leboulleux et al., 2004) (Εικόνα 8). Ο μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί μέρος μίας αυτοσωματικής κληρονομικά επικρατούς διαταραχής (πολλαπλή ενδοκρινή νεοπλασία [MEN] τύπου 2Α και 2Β και οικογενή MTC) περίπου στο 20% των περιπτώσεων, διαφορετικά εμφανίζεται σποραδικά απουσία οικογενειακού ιστορικού (Trimboli et al., 2013). Στις περισσότερες περιπτώσεις εμφανίζεται ως κάποιο οζίδιο σε ασθενείς ηλικίας 40 – 60 χρονών. Ενίοτε, η πρώτη εκδήλωση είναι η τραχηλική λεμφαδενοπάθεια, διότι η ασθένεια συχνά μετασταίνεται στους τραχηλικούς λεμφαδένες (Cabanillas et al., 2016). Τα σποραδικά καρκινώματα έχουν συνήθως βαρύτερη πρόγνωση από τα οικογενή. Τέλος, ο μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς χαρακτηρίζεται από μία δεκαετή επιβίωση, σε ποσοστό 40 - 60%, με την οικογενή μορφή να έχει καλύτερη πρόγνωση.

Ο θάνατος συνήθως επέρχεται μετά από εκτεταμένες μεταστάσεις, οι οποίες αφορούν κυρίως τους τραχηλικούς λεμφαδένες και το μεσοθωράκιο, ενώ ακολουθούν οι πνεύμονες, το ήπαρ και τα οστά. Η μόνη αποτελεσματική θεραπεία για τον μυελοειδή καρκίνο είναι η χειρουργική επέμβαση, η οποία αφορά ολική θυρεοειδεκτομή και ριζικό λεμφαδενικό τραχηλικό καθαρισμό (Leboulleux et al., 2004).

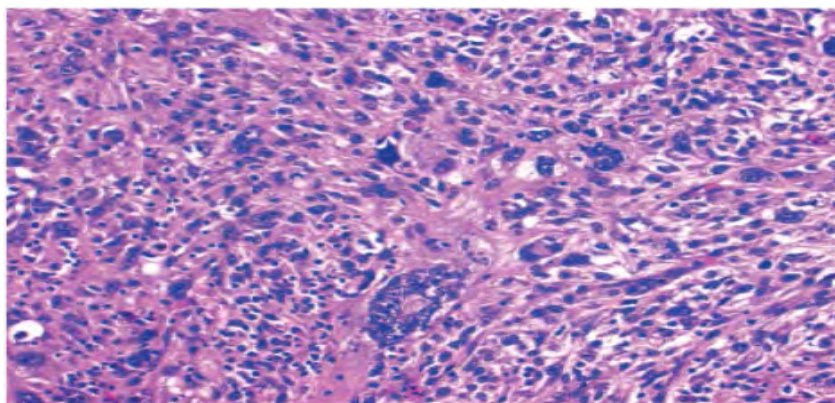


Εικόνα 8 : Μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς.

1.2.2.4. Αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς

Ο αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς (Anaplastic Thyroid Carcinoma, ATC), αποτελεί ένα αδιαφοροποίητο όγκο υψηλής κακοήθειας που προέρχεται από το επιθήλιο του θυρεοειδικού θυλακίου. Ο ATC είναι μια πολύ σπάνια κακοήθεια που υπολογίζεται ότι αποτελεί το 1–2% του συνόλου των καρκίνων του θυρεοειδούς, το οποίο αντιπροσωπεύει το 3.6% όλων των ανθρώπινων όγκων (Molinaro et al., 2017). Λόγω της σπανιότητας αυτού του τύπου καρκίνου, οι πραγματικές περιπτώσεις δεν είναι γνωστές, έχουν γίνει όμως αναφορές ότι είναι υψηλότερες στην Ευρώπη από ότι στις Η.Π.Α (Davies & Welch, 2006). Αυτή την στιγμή ο κατά προσέγγιση αριθμός των ασθενών είναι 1 – 2 άτομα ανά εκατομμύριο κάθε χρόνο (Tiedje et al., 2018). Οι περισσότερες περιπτώσεις με αναπλαστικό καρκίνο του θυρεοειδούς είναι στις ηλικίες μεταξύ της 6ης και 7ης δεκαετίας, με αναλογία μεταξύ γυναικών και ανδρών 1.5 : 2 (Molinaro et al., 2017). Ο καρκινικός όγκος έχει μεγάλη έκταση από 3 έως 20 cm και επεκτείνεται κατά κανόνα σε όλο τον θυρεοειδικό αδένα. Αποτελείται από μεγάλα ατρακτοειδή τελείως άτυπα κύτταρα που διατάσσονται ακανόνιστα και μερικές φορές παρατηρείται γιγαντιαία ή πλακώδης διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων. Τα κύτταρα του όγκου δεν παράγουν θυρεοσφαιρίνη. Υπολείμματα διαφοροποιημένου καρκίνου του θυρεοειδή μπορεί να εντοπίζονται κατά τόπους στο εσωτερικό του όγκου (Molinaro et al., 2017) (Εικόνα 9). Ο ATC δίνει απομακρυσμένες μεταστάσεις στο 50% των ασθενών (Molinaro et al., 2017), με την πιο κοινή στους πνεύμονες και ακολουθούν τα οστά και ο εγκέφαλος (Cabanillas et al., 2016). Παρά το γεγονός ότι ο ATC εκπροσωπεί λιγότερο του 2% των θυρεοειδικών καρκινωμάτων, εκτιμάται ότι ένα ποσοστό που φθάνει έως και 39% των θανάτων των καρκίνων του θυρεοειδούς οφείλονται σε αυτόν.

Ο μέσος όρος επιβίωσης κατά προσέγγιση είναι 5 έως 6 μήνες και μόνο το 10 – 15% των ασθενών επιβιώνουν στα 2 χρόνια μετά την εκδήλωση του καρκίνου. Ως στιγμή δεν υπάρχει διαθέσιμο θεραπευτικό σχήμα για θεραπεία ή για επέκταση της ζωής των ασθενών με αναπλαστικό καρκίνο. Παρόλο αυτά, μερικά καινούρια φάρμακα, κυρίως αναστολείς κινάσων τυροσίνης (TKIs), έχουν δοκιμαστεί και βρίσκονται στην δεύτερη φάση κλινικών δοκιμών (Molinaro et al., 2017).



Εικόνα 9: Αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς.

1.2.2.5. Διάγνωση και θεραπεία του θυρεοειδούς καρκίνου

Τα οζίδια του θυρεοειδούς είναι συχνά και ανιχνεύονται σε ποσοστό έως και 65% στον γενικό πληθυσμό. Αυτό είναι πιθανόν να οφείλεται στην όλο και πιο συχνή χρήση των διαγνωστικών απεικονίσεων ακόμη και για σκοπούς που δεν σχετίζονται με τον θυρεοειδή αδένα. Τα περισσότερα οζίδια του θυρεοειδούς είναι καλοήγη, χωρίς κάποια κλινική σημαντικότητα, και είναι ασφαλή στη διαχείρισή τους όταν παρακολουθούνται με ένα πρόγραμμα επιτήρησης.

Τα οζίδια μπορούν να εντοπιστούν είτε με φυσική εξέταση (ψηλάφηση λαιμού) είτε με απεικονιστικές μεθόδους, όπως υπερηχογράφημα, υπολογιστική τομογραφία (CT) και μαγνητική τομογραφία (MRI). Το υπερηχογράφημα είναι το πρωτεύον εργαλείο που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση των θυρεοειδικών οζιδίων και εφόσον κριθεί απαραίτητο πραγματοποιείται βιοψία δια λεπτής βελόνης (Fine Needle Aspiration Biopsy, FNAB), κατά την οποία αναρροφάται ένα ιστοτεμάχιο από την βλάβη και αποστέλλεται για κυτταρολογική εξέταση. Στην περίπτωση που θα διαγνωστεί κακοήθεια ή ο όζος προκαλεί πιεστικά φαινόμενα, πρέπει να αποφασιστεί η χειρουργική αφαίρεσή του. Η αντιμετώπιση του καρκίνου του θυρεοειδούς περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Χειρουργικά (θυρεοειδεκτομή)
- Χορήγηση θυρεοειδικών ορμονών
- Χορήγηση θεραπευτικού ραδιενεργού ιωδίου
- Μακροχρόνια παρακολούθηση

Σε όλους τους ασθενείς που έχει διαγνωστεί καρκίνος του θυρεοειδούς, συνίσταται η ολική αφαίρεση του αδένος ανεξάρτητα από ποιο κλινικό στάδιο βρίσκεται (Mazzaferri et al., 1995) και ακολουθεί θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο (Nikiforov, 2008). Ο σκοπός της θυρεοειδεκτομής είναι η αφαίρεση του πρωτογενούς όγκου, η ελαχιστοποίηση της νοσηρότητας όπως και επίσης του κινδύνου υποτροπής και μετάστασης, ενώ με το ραδιενεργό ιώδιο επιτυγχάνεται η καταστροφή πιθανών υπολειμμάτων κακοήθων κυττάρων ή/και λεμφαδενικών μεταστάσεων (Mazzaferri et al., 1994;1981). Εντούτοις, όγκοι χαμηλής διαφοροποίησης, όπως ο αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς, ο οποίος είναι ήδη διαδεδομένος όταν διαγνωστεί και η χειρουργική επέμβαση συχνά δεν είναι χρήσιμη ως θεραπεία, και ο μυελοειδής, αδυνατούν να προσλάβουν τον ραδιενεργό ιώδιο για αυτόν τον λόγο αυτοί οι τύποι καρκίνου είναι υποψήφιοι για θεραπευτικές προσεγγίσεις διαφορετικού τύπου, όπως στοχευόμενες μοριακά θεραπείες (Nikiforov, 2008), εξωτερική ραδιοθεραπεία, χημειοθεραπεία καθώς και συνδυασμός των δύο (Molinaro et al., 2017).

1.3. Σηματοδοτικό μονοπάτι των RAS-MAPK

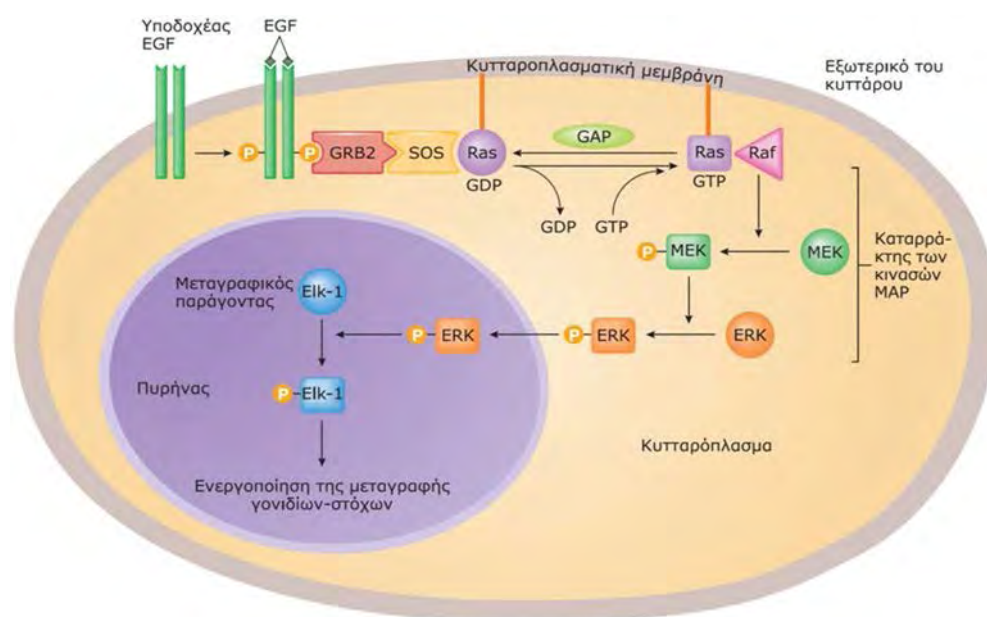
Το μονοπάτι RAS/MAPK συνιστά έναν καταρράκτη που συχνά ξεκινά με την ενεργοποίηση ενός υποδοχέα με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, όπως είναι για παράδειγμα ο υποδοχέας των αυξητικών παραγόντων PDGF (platelet derived growth factor) ή EGF (epidermal growth factor). Ο υποδοχέας μετά την αλληλεπίδρασή του με τον προσδέτη ενεργοποιεί, με την βοήθεια μίας πρωτεΐνης-προσαρμοστή το μονοπάτι RAS. Η ενεργοποίηση της RAS οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης σερίνης/θρεονίνης Raf, και αυτή με την σειρά της κινητοποιεί την κινάση MEK, όνομα το οποίο οφείλεται στο ότι αυτό το ένζυμο φωσφορυλιώνει και συνεπώς ενεργοποιεί μια κινάση MAP (Mitogen Activated Protein Kinase). Το όνομα της οικογένειας των κινασών MAP οφείλεται στο ότι τα ένζυμα αυτά πρωτοχακτηρίστηκαν ως κινάσες που ενεργοποιούνται κατά την απόκριση σε μιτογόνα.

Ο καταρράκτης που περιλαμβάνει τις αντιδράσεις από την ενεργοποίηση της κινάσης MEK μέχρι και τα τελικά προϊόντα αναφέρεται ως μονοπάτι κινάσης MAP (MAPK). Στον καταρράκτη αυτό κάθε κινάση φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την ενεργότητα κινάσης του επόμενου στόχου της. Ο καταρράκτης των φωσφορυλιώσεων οδηγεί τελικά στην φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι προκαλούν ποικίλες αλλαγές στον κυτταρικό φαινότυπο ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου. Επιπλέον, στόχους των κινασών αποτελούν και πρωτεΐνες του κυτταρικού σκελετού, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τη δομή του κυττάρου (Genes VIII).

Αναλυτικά, η πρόσδεση του αυξητικού παράγοντα EGF στον υποδοχέα του διεγείρει την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα. Στην συνέχεια, η πρωτεΐνη Grb2 δεσμεύεται στο φωσφορυλιωμένο υποδοχέα και το σύμπλοκο προσελκύει την πρωτεΐνη SOS στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η

πρωτεΐνη SOS εκτοπίζει το νουκλεοτίδιο GDP από την Ras (η οποία βρίσκεται αγκυροβολημένη στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης), επιτρέποντας κατ'αυτόν τον τρόπο στη RAS να δεσμεύσει GTP. Το σύμπλοκο RAS-GTP δεσμεύει την πρωτεΐνη Raf-1 και την ενεργοποιεί. Αυτό δίνει το έναυσμα για μία σειρά διαδοχικών φωσφορυλιώσεων πρωτεϊνών που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα (καταρράκτης κινασών MAP), οι οποίες τελικά οδηγούν στην φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης ERK. Η φωσφορυλιωμένη μορφή της ERK μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του Elk-1. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες επάγουν την μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων στόχων που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (i-genetics Petter J. Russel)(Εικόνα 10).

Στα φυσιολογικά κύτταρα, η διακοπή της σηματοδότησης από την Ras επιτυγχάνεται μέσω της δράσης την πρωτεΐνης GAP (GTPase Activating Protein, πρωτεΐνη που ενεργοποιεί την GTPάση), η οποία αναγκάζει τη Ras να υδρολύσει το νουκλεοτίδιο GTP που έχει δεσμευμένο, μετατρέποντας το σε GDP. Με αυτόν τον τρόπο αδρανοποιείται η Ras και παύει η μεταγωγή των σημάτων που διεγείρουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (i-genetics Petter J. Russel).



Εικόνα 10: Σηματοδοτικό μονοπάτι RAS-MAPK

πηγή: oregonstate.edu/instruction/bb492/fignames/ras3

1.3.1. Πρωτεΐνες RAS

Τα γονίδια RAS (H-RAS, K-RAS, και N-RAS) κωδικοποιούν υψηλής συγγένειας G-πρωτεΐνες, οι οποίες βρίσκονται στην εσωτερική μεριά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και έχουν κύριο λόγο την διακυτταρική μεταγωγή σημάτων που προέρχονται από τους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης της κυτταρικής μεμβράνης και υποδοχείς που συνδέονται με πρωτεΐνες G. Στην ανενεργή μορφή της, η RAS πρωτεΐνη είναι συνδεδεμένη με την διφωσφορική γουανοσίνη (guanosine diphosphate-GDP). Κατά την ενεργοποίησή της απελευθερώνει την GDP και δεσμεύει τριφωσφορική γουανοσίνη (guanosine triphosphate-GTP), ενεργοποιώντας το μονοπάτι MAPK και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το P13K/AKT. Φυσιολογικά η ενεργή RAS-GTP πρωτεΐνη, μεταπίπτει γρήγορα στην ανενεργή της μορφή, εξαιτίας της εγγενούς δραστηριότητας της τριφωσφατάσης γουανοσίνης (guanosine triphosphatase-GTPase) και της δράσης των ενεργοποιημένων από την GTPάση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, οι οποίες καταλύουν την μετατροπή της δραστικής μορφής GTP στην ανενεργή προσδεσμένη GDP μορφή. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί η συμβολή του παράγοντα GEF (guanine nucleotide exchange factors) και GAP (GTPase-activating protein). Η GEF διευκολύνει την απομάκρυνση του GDP από την πρωτεΐνη G και την δέσμευση στη θέση του, το GTP. Ενώ από την άλλη πλευρά ο παράγοντας GAP, καταλύει την υδρόλυση του GTP (αύξηση του ρυθμού υδρόλυσης του GTP) μετατρέποντας το σε GDP (J.Bos et al., 2007).

1.3.2. Πρωτεΐνες BRAF

Η οικογένεια των RAF γονιδίων περιλαμβάνει τρεις ισομορφές τις CRAF, BRAF και ARAF οι οποίες είναι οι κύριοι ρυθμιστές στο ενδοκυτταρικό μονοπάτι της κινάσης MAP και δρουν κυρίως με φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της MEK (Matallanas et al., 2011). Το γονίδιο BRAF που εντοπίζεται στο γονίδιο 7 (7q34) κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BRAF η οποία είναι μια πρωτεΐνη κινάσης σερίνης-θρεονίνης (Hussain et al., 2014) με μοριακό βάρος από 75 -100 kDa (Wellbrock et al., 2004) η οποία είναι η ισχυρότερη ισομορφή ενεργοποίησης του MAPK μονοπατιού (Caronia et al., 2011). Η ανακάλυψη μεταλλάξεων στα σωματικά κύτταρα του γονιδίου BRAF ότι συμβάλλει στην καρκινογένεση σε διάφορους ιστούς, όπως το μελάνωμα, τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, τον καρκίνο του παχέος εντέρου, το θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς και τον καρκίνο των ωοθηκών (Davies et al, 2002).

1.4. Μοριακή διάγνωση του καρκίνου του θυρεοειδούς

1.4.1. Γενικά

Τα τελευταία χρόνια, οι γνώσεις μας στην μοριακή γενετική του καρκίνου του θυρεοειδούς έχουν αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό. Η γνώση αυτή έχει αρχίσει ήδη να μεταφέρεται στην κλινική πράξη, με αποτέλεσμα να προσφέρει μία αξιοσημείωτη βελτίωση στην προεγχειρητική διάγνωση του καρκίνου του θυρεοειδούς καθώς και στην πιο έγκυρη πρόγνωση του καρκίνου (Nikiforova et al, 2009). Μία στρατηγική αυτού του είδους είναι η διάγνωση μεταλλάξεων που υπάρχουν από τους όζους του θυρεοειδούς, οι οποίοι έχουν ληφθεί με παρακέντηση λεπτής βελόνης και στη συνέχεια στην υποβολή αυτών σε μοριακές τεχνικές διάγνωσης (Fallahi et al, 2014).

Αρκετοί μοριακοί προγνωστικοί δείκτες του καρκίνου του θυρεοειδούς, και ιδιαίτερα οι γενετικοί δείκτες, είναι πολλά υποσχόμενοι. Μερικοί από αυτούς απαντώνται μόνο στον χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνο ή στον αναπλαστικό καρκίνο του θυρεοειδούς, όπως οι μεταλλάξεις στα γονίδια p53 και ALK. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες, ελέγχοντας την επιθετικότητα του καρκίνου (Xing et al, 2013).

Στην κλινική πράξη, τα πιο δύσκολα και συχνά προβλήματα έχουν να κάνουν με την διάγνωση και την πρόγνωση των υψηλής διαφοροποίησης καρκίνων του θυρεοειδούς, για αυτόν τον λόγο, οι περισσότερες νέες ανακαλύψεις στην μοριακή διαγνωστική επικεντρώνονται σε αυτούς τους τύπους καρκίνου. Οι κύριοι τύποι που απαρτίζουν το μεγαλύτερο κομμάτι των γνωστών καρκίνων του θυρεοειδούς είναι τέσσερις, οι οποίοι ανήκουν στον θυλακιώδη και θηλώδη καρκίνο και φέρουν το μεγαλύτερο αντίκτυπο στην διάγνωση και την πρόγνωση του όγκου. Αυτοί οι τύποι καρκίνου φέρουν τις σημειακές μεταλλάξεις BRAF και RAS καθώς και τις αναδιατάξεις RET/PTC και PAX8/PPARγ που αναλύονται στη συνέχεια (Nikiforova et al, 2009).

1.4.2. Μεταλλάξεις BRAF

Η BRAF είναι μία πρωτεϊνική κινάση σερίνης-θρεονίνης που ανήκει στην οικογένεια των RAF πρωτεϊνών, οι οποίες είναι ενδοκυτταρικοί τελεστές του σηματοδοτικού καταρράκτη MAPK. Η ενεργοποίησή τους οδηγεί στη φωσφορυλίωση και επακόλουθη ενεργοποίηση όλων των στόχων του σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK.

Σημειακές μεταλλάξεις του BRAF γονιδίου είναι οι πιο κοινές γενετικές διαφοροποιήσεις που απαντώνται στο θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς, σε ποσοστό περίπου 40% με 45%. Οι περισσότερες μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί στον καρκίνο του θυρεοειδούς είναι σημειακές μεταλλάξεις οι οποίες αφορούν στο νουκλεοτίδιο 1799 και οδηγούν στην αντικατάσταση μίας βαλίνης με μία γλουταμίνη στο κατάλοιπο 600 (V660E). Αυτή η μετάλλαξη οδηγεί στην συστηματική

ενεργοποίηση της BRAF κινάσης και την χρόνια διέγερση του MAPK μονοπατιού, με αποτέλεσμα τα θυρεοειδικά κύτταρα να γίνουν ογκογόνα. Η μετάλλαξη BRAF V600E δεν έχει βρεθεί σε θυλακιώδη καρκινώματα και καλοήθεις όγκους του θυρεοειδούς και ως εκ τούτου η μετάλλαξη αυτή αποτελεί έναν αρκετά ειδικό δείκτη για τον θηλώδη καρκίνο και τους υποτύπους του (Xing, 2005). Έχουν εντοπιστεί και άλλες διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου του BRAF της τάξεως του 1% με 2% των περιστατικών θηλώδους καρκινώματος. Μερικές από αυτές είναι η σημειακή μετάλλαξη στο K601E και μικρές προσθήκες ή διαγραφές που περιβάλλουν το κωδικόνιο 600 καθώς επίσης η αναδιάταξη AKAP9/BRAF η οποία εμφανίζεται πιο συχνά σε θηλώδη καρκινώματα που συνδέονται με έκθεση σε ακτινοβολίες. Τέλος, η μετάλλαξη K601E έχει αναφερθεί σε μεμονωμένες περιπτώσεις θυλακιώδους αδενώματος (Nikiforov et al., 2011).

1.4.3. Μεταλλάξεις RAS

Οι σημειακές μεταλλάξεις των γονιδίων RAS που περιλαμβάνουν τα HRAS, KRAS, NRAS δεν περιορίζονται σε κάποιο συγκεκριμένο όγκο και έχουν εντοπιστεί στο θηλώδες καρκίνωμα, στο θυλακιώδες καρκίνωμα και στο θυλακιώδες αδένωμα (Nikiforova et al., 2009). Ενώ στους περισσότερους καρκίνους οι πιο συχνές σημειακές μεταλλάξεις απαντώνται στα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου KRAS, στον καρκίνο του θυρεοειδούς πιο συχνά συναντούνται στο κωδικόνιο 61 του γονιδίου NRAS και στο κωδικόνιο 61 του γονιδίου HRAS (Nikiforov, 2011). Οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίζονται σε ποικίλη συχνότητα σε όλους τους τύπους κακοηθειών του επιθηλίου του θυρεοειδούς. Στο κλασικό τύπο θυλακιώδους καρκινώματος εντοπίζεται στο 40-50% των περιπτώσεων, ενώ στο θυλακιώδες αδένωμα στο 20-40% (Namba et al., 1990). Επίσης, μεταλλάξεις έχουν βρεθεί και στον θηλώδη καρκινώματα σε ποσοστό 10-20%, φαίνεται ότι όλα τα καρκινώματα αυτά που φέρουν μία μετάλλαξη RAS, αποτελούν την θυλακιώδη παραλλαγή (Adeniran et al., 2006; Zhu et al., 2003).

Μελέτες έχουν δείξει μία σχετική συσχέτιση μεταξύ των μεταλλάξεων RAS και της μεταστατικής συμπεριφοράς των θηλωδών και θυλακιδωδών καρκινωμάτων. Από την άλλη πλευρά μεταλλάξεις στα γονίδια RAS εντοπίζονται συχνά σε ενθυλακωμένους τύπους της θυλακιώδους παραλλαγής του θηλώδους καρκίνου. Για αυτό τον λόγο, είναι πιθανό οι μεταλλάξεις αυτές να αποτελούν έναν δείκτη των καλά διαφοροποιημένων καρκίνων, οι οποίοι έχουν την τάση να προκαλούν μεταστάσεις και αποδιαφοροποιούνται. Ωστόσο δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένας γενικός προγνωστικός μάρτυρας για όλους τους τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς.

Ο εντοπισμός μεταλλάξεων RAS σε ένα οζίδιο του θυρεοειδή παρέχει ισχυρή απόδειξη για κάποια νεοπλασία, αλλά δεν αρκεί για την διάγνωση κακοήθειας. Εντούτοις, η διαγνωστική τους αξία είναι σημαντική γιατί αποτελούν τον δεύτερο πιο συχνό τύπο μετάλλαξης που ανιχνεύεται από βιοψία λεπτής βελόνης σε όζους του θυρεοειδούς (Nikiforov, 2011).

1.4.4. Αναδιατάξεις RET/PTC

Οι αναδιατάξεις RET/PTC είναι άλλη μία γενετική παραλλαγή που εντοπίζεται στα θηλώδη καρκινώματα (Santoro et al., 1992). Οι αναδιατάξεις αυτές σχηματίζονται από την ένωση μεταξύ του 3' τμήματος του RET γονιδίου, ο οποίος είναι ένας υποδοχέας κινάσης τυροσίνης, με το 5' τμήμα από ποικίλα μη συγγενικά γονίδια (Nikiforova et al., 2009). Από τις έντεκα γνωστές αναδιατάξεις RET/PTC, οι δύο πιο κοινοί τύποι αναδιάταξης που απαντώνται στον καρκίνο του θυρεοειδούς είναι οι RET/PTC1 και RET/PTC3. Η RET/PTC1 σχηματίζεται με την σύντηξη με το γονίδιο CCDC6 (H4), ενώ η αναδιάταξη RET/PTC3 σχηματίζεται με την σύντηξη με το γονίδιο NCOA4(ELE1). Όλες οι ενώσεις περιλαμβάνουν άθικτη την περιοχή του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης, η οποία επιτρέπει στην πρωτεΐνη RET/PTC να ενεργοποιήσει το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK (Nikiforov, 2011).

Οι αναδιατάξεις RET/PTC απαντώνται περίπου στο 20% των ενήλικων σποραδικών θηλωδών καρκινωμάτων, ενώ σε ασθενείς που έχουν ιστορικό έκθεσης σε ραδιενέργεια τα ποσοστά είναι αρκετά μεγαλύτερα της τάξης 50-80% και σε παιδιά και νεαρά άτομα με θηλώδη καρκίνο σε ποσοστό 40-70% (Nikiforova et al., 2009). Τα νεαρά άτομα που φέρουν την αναδιάταξη RET/PTC στο θηλώδη καρκίνο εμφανίζουν κλασική θηλώδη ιστολογία και έχουν υψηλό δείκτη μετάστασης στους λεμφαδένες (Adeniran et al., 2006). Ο εντοπισμός των αναδιατάξεων RET/PTC από βιοψία λεπτής βελόνης, μπορεί να αυξήσει την προεγχειρητική διάγνωση των θυρεοειδικών οζιδίων, ιδιαίτερα σε δείγματα ασθενών απροσδιόριστης κυτταρολογίας ή σε περιπτώσεις που τα δείγματα δεν έχουν επαρκή αριθμό κυττάρων για την κυτταρολογική εξέταση (Cheung et al. 2001).

1.4.5. Αναδιατάξεις PAX8/PPARγ

Η αναδιάταξη PAX8/PPARc προκύπτει από την μετατόπιση t (2;3) (q13;p25), που οδηγεί στην σύντηξη του γονιδίου PAX8, το οποίο κωδικοποιεί ένα ζεύγος του τομέα του μεταγραφικού παράγοντα και στο γονίδιο του υποδοχέα PPARc (peroxisome proliferator-activated receptor) (Kroll et al., 2000). Οι αναδιατάξεις PAX8/PPARc οδηγούν σε υπερέκφραση της πρωτεΐνης PPARγ, η οποία μπορεί να εντοπιστεί ανοσοϊστοχημικά (Nikiforova et al., 2002; Kroll et al., 2000). Η αναδιάταξη PAX8/PPARc εντοπίζεται στο 30% με 40% του κλασσικού τύπου θυλακιώδους καρκινώματος και με χαμηλότερη συχνότητα ογκοκυτταρικά καρκινώματα (Nikiforova et al., 2003; Dwight et al., 2003; French et al., 2003).

Οι όγκοι που προκύπτουν από την αναδιάταξη αυτή τείνουν να εμφανίζονται σε νεότερη ηλικία, είναι μικρότεροι σε μέγεθος, ενώ παρουσιάζουν και αγγειακή εισβολή (Nikiforova et al., 2003; French et al., 2003). Η αναδιάταξη PAX8/PPARc εντοπίζεται επίσης και στο θυλακιώδη τύπο του θηλώδους καρκινώματος, με συνήθως μικρή συχνότητα της τάξεως του 5% και λιγότερο (Nikiforova et al., 2002, French et al., 2003), αν και υπάρχει και μία αναφορά για συχνότητα που ανέρχεται στο 38%

(Castro P et al., 2006). Επιπρόσθετα, η αναδιάταξη PAX8-PPARc μπορεί να εντοπιστεί και στα θυλακιώδη αδενώματα σε μικρά ποσοστά της τάξεως 2% με 13% (Nikiforova et al., 2003; Dwight et al., 2003; Marques et al., 2002).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι αναδιατάξεις PAX8-PPARc και οι σημειακές μεταλλάξεις σε γονίδια RAS σπάνια εντοπίζονται στον ίδιο όγκο, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα θυλακιώδη καρκινώματα μπορούν να αναπτυχθούν μέσω τουλάχιστον δύο διακριτών μονοπατιών, είτε του PAX8-PPARc είτε του RAS (Nikiforova et al., 2003). Τέλος, ο εντοπισμός της αναδιάταξης PAX8-PPARc στις θυλακιώδεις αλλοιώσεις δεν αποτελεί εξολοκλήρου ένα διαγνωστικό μέσο για κακοήθεια, αν και συνήθως η παρουσία του σχετίζεται με αυτή (Nikiforov, 2011).

1.4.6. Αντίστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης(TERT)

1.4.6.1. Τελομερή και τελομεράση

Στις αρχές του 1930, οι Herman J. Muller και Barbara McClintock περιέγραψαν τα τελομερή (από τις ελληνικές λέξεις τέλος και μέρος) ως μία προστατευτική υποδομή στο τερματικό άκρο του χρωμοσώματος. Και αυτό γιατί η έλλειψη της οδηγεί στη συγχώνευση του χρωμοσώματος, κάτι το οποίο έχει ως επακόλουθο τον κυτταρικό θάνατο (Greider et al., 1996). Τα ανθρώπινα τελομερή αποτελούνται από μακρές συστοιχίες από επαναλήψεις TTAGGG που σχηματίζουν νουκλεοπρωτεϊνικά συμπλέγματα στο τέλος των χρωμοσωμάτων. Η διατήρηση του μήκους των τελομερών μπορεί να επιτευχθεί με πολλούς τρόπους αλλά η επιμήκυνση με τη μεσολάβηση της τελομεράσης είναι η κυρίαρχη οδός στον άνθρωπο. Η τελομεράση είναι μία ριβονουκλεοπρωτεϊνική πολυμεράση η οποία διατηρεί τα άκρα των τελομερών προσθέτοντας την αλληλουχία TTAGGG. Το ένζυμο αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό συστατικό με δραστικότητα αντίστροφης μεταγραφάσης, το οποίο κωδικοποιείται από το γονίδιο TERT και από ένα συστατικό RNA (hTR) το οποίο χρησιμοποιείται ως πρότυπο για την τελομερική επανάληψη.

Οι πρωτεΐνες στο σύμπλεγμα των τελομερών μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: πρωτεΐνες που συνδέονται άμεσα με το τελομερικό DNA και πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες δέσμησης. Στον άνθρωπο, το πιο σημαντικό πρωτεϊνικό συστατικό είναι ένα σύμπλεγμα έξι πρωτεϊνών που αποτελείται από τις πρωτεΐνες TIN2, Rap1, TPP1 και POT1 και τους παράγοντες δέσμησης στις επαναλήψεις TTAGGG, TRF1, TRF2 (de Lange, 2005).

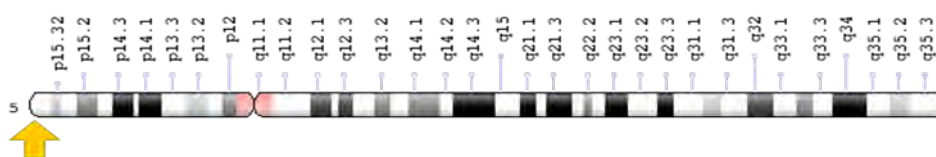
Ειδικότερα η TRF1 έχει συσχετιστεί με την διαχείριση του μήκους των τελομερών (van Steensel, 1997).

Η αντίστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης (Telomerase Reverse Transcriptase, TERT) είναι μια καταλυτική πρωτεϊνική υπομονάδα της τελομεράσης, η οποία μαζί με μία αναπόσπαστη υπομονάδα RNA και μερικές ειδικευμένες προς το είδος πρωτεΐνες, έχει την λειτουργία να προσθέτει τελομερή, στο τέλος των χρωμοσωμάτων (Moyzis et al.1988), ώστε να διατηρείται η χρωμοσωμική ακεραιότητα και η γονιδιωματική σταθερότητα (Greider & Blackburn, Blasco 2005).

Η τελομεράση εκφράζεται καλύτερα στα κύτταρα της γεννητικής σειράς και στα βλαστοκύτταρα και λιγότερο στα σωματικά κύτταρα. Στα σωματικά κύτταρα, η απώλεια των τελομερών λαμβάνει χώρα στη διάρκεια του κάθε κύκλου της κυτταρικής διαίρεσης, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να εισέρχονται στον κυτταρικό γηρασμό όταν φτάσουν τα τελομερή σε ένα κρίσιμο μήκος (Blasco 2005). Σε αντίθεση με τη φυσιολογική λειτουργία, η τελομεράση ενεργοποιείται ξανά σε πολλούς καρκίνους (Kim et al., 1994), κάτι που αποτρέπει να γίνει η απαραίτητη περικοπή των τελομερών, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται στα καρκινικά κύτταρα να αναπαράγονται επ' άπειρον (Hanahan & Weinberg, 2011). Συγκριτικά με την υπομονάδα του RNA, η TERT παίζει κυρίαρχο ρόλο στην ενεργοποίηση της τελομεράσης κατά την διάρκεια μετατροπής των κυττάρων σε κακοήγη κύτταρα (Janknecht, 2004). Η TERT μπορεί ακόμη να διαμορφώνει την έκφραση γονιδίων που ελέγχουν την ανάπτυξη (Smith et al., 2003), άμεσα ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση της εξαρτώμενης NFκB (Ghosh et al., 2012), και σταθεροποιεί τα επίπεδα MYC στην χρωματίνη (Koh et al., 2015). Λόγω αυτών των λειτουργιών της TERT έχει προταθεί ότι μπορεί να δρά ως ένα ογκογονίδιο, με έναν ανεξάρτητο προς τα τελομερή τρόπο (Wyatt et al., 2010).

1.4.6.2. Το γονίδιο TERT

Το ανθρώπινο γονίδιο TERT αποτελείται από 16 εξόνια και 15 ιντρόνια και παρουσιάζεται ως μοναδικό αντίγραφο. Εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 5p15.33 και εκτείνεται πάνω από 40 kb (Cong et al., 1999; Bryce et al. 2000). Έχει αποδεχθεί πως ο υποκινητής του TERT είναι το πιο σημαντικό στοιχείο για την έκφραση της τελομεράσης (Cukusic et al., 2008). Αν και είναι πλούσιο σε δινουκλεοτίδια CpG και θέσεις δέσμευσης του Sp1, ο υποκινητής της TERT εμφανίζει έλλειψη από περιοχές TATA και CAAT (Horrikawa et al., 1999; Takakura et al., 1999).



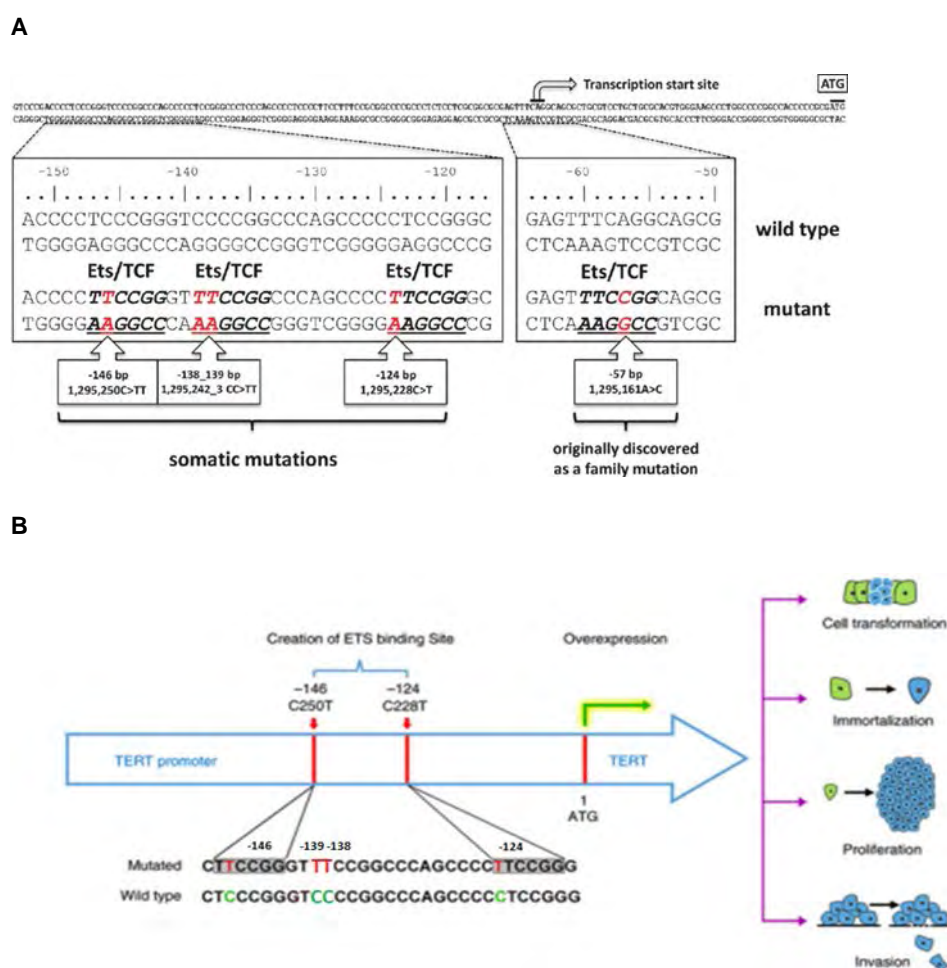
Εικόνα 11 : Η θέση του γονιδίου TERT στο χρωμόσωμα 5, (p βραχίονα θέση 15.33).

1.4.6.3. Μεταλλάξεις TERT στο καρκίνο

Γονιδιακές μελέτες σε όλο το γονιδίωμα εντόπισαν πολλαπλές παραλλαγές στον γονιδιακό τόπο της TERT που σχετίζονται με το μήκος των τελομερών και την επικινδυνότητα ορισμένων καρκίνων. Η πιο σημαντική πρόοδος στην κατανόηση του γενετικού ρόλου της TERT στον καρκίνο του ανθρώπου ήταν το ορόσημο της ανακάλυψης των μεταλλάξεων στον υποκινητή του γονιδίου TERT στο μελάνωμα στις αρχές του 2013 (Horn et al., 2013; Huang et al., 2013). Σύντομα οι μεταλλάξεις αυτές βρέθηκαν και σε άλλους καρκίνους, όπως στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, στο γλοιοβλάστωμα καθώς και στον καρκίνο του θυρεοειδούς (Liu et al.,

2013). Όπως φαίνεται στην εικόνα 11, υπάρχουν κυρίως δύο μεταλλάξεις που οδηγούν σε μετατροπή της κυτοσίνης σε θυμίνη, οι οποίες εντοπίζονται στις θέσεις -124 και -146 bp από την θέση ATG και ονομάζονται C228T και C250T αντίστοιχα. Επίσης διακρίνεται και μία τρίτη σωματική μετάλλαξη στις θέσεις -139 και -138 bp στις οποίες η κυτοσίνη και στις 2 θέσεις μετατρέπεται σε θυμίνη και ονομάζονται ως C243T και C242T. Οι μεταλλάξεις αυτές δημιουργούν μια θέση πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες ETS (E-twenty-six transcriptional factors) μέσα στην περιοχή του εκκινητή της TERT (Εικόνα 12). Επειδή οι μεταγραφικοί παράγοντες ETS μπορούν να ενεργοποιηθούν μέσω της απορύθμισης των MAP κινασών, έτσι παρέχουν τον υποκινητή της TERT αυξημένη μεταγραφική ικανότητα, κάτι που παρέχει μία μηχανιστική εξήγηση για τον ογκογόνο ρόλο των μεταλλάξεων στον υποκινητή της TERT στον καρκίνο του ανθρώπου (Horn et al.,2013;Huang et al.,2013).

Εικόνα 12:



A. Οι σημειακές μεταλλάξεις στην περιοχή του υποκινητή της τελομεράσης, -146bp (C250T) , -139 -138bp (C243T,C242T) και -124bp (C228T) δημιουργούν θέσεις πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες ETS.

B. Παρουσιάζονται οι συνέπειες των ανωτέρω μεταλλάξεων, που οδηγούν στην υπερέκφραση του γονιδίου TERT και προκαλούν κυτταρική διαφοροποίηση, αθανатоποίηση, ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κυτταρική διείσδυση.

1.4.6.4. Μεταλλάξεις TERT στον καρκίνο του θυρεοειδούς

Οι πιο συχνές μεταλλάξεις του γονιδίου TERT στον καρκίνο του θυρεοειδούς είναι οι C228T και C250T, οι οποίες είναι αμοιβαία αποκλειόμενες, δηλαδή δεν συνυπάρχουν στον ίδιο όγκο. Αυτό υποδηλώνει ότι κάθε μία μπορεί να λειτουργήσει επαρκώς ώστε να προκαλέσει την ογκογένεση στον θυρεοειδή (Liu et al., 2016). Μελέτες έχουν δείξει ότι σε καλοήθεις όγκους δεν απαντώνται μεταλλάξεις ενώ το ποσοστό των μεταλλάξεων στον χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνο του θυρεοειδούς και στον αναπλαστικό καρκίνο είναι 38-46% και το ποσοστό στον θηλώδη και θυλακιώδη καρκίνο είναι 12-14% (Liu et al., 2013). Επίσης φαίνεται ότι η μετάλλαξη C228T είναι πολύ πιο διαδεδομένη από την C250T στον καρκίνο του θυρεοειδούς. Συγκεκριμένα η μελέτη κατανομής των μεταλλάξεων TERT στον καρκίνο του θυρεοειδούς αδένα έδειξε ότι το ποσοστό των C228T και C250T είναι 9,7% και 2,1% σε PTC, 15,7% και 2,5% σε FTC, 33,8% και 15,0% σε PDTC, 37,7% και 4,1% σε ATC αντίστοιχα. Δεν βρέθηκε ωστόσο μετάλλαξη στον υποκινητή του γονιδίου TERT σε MTC. Το πρότυπο εμφάνισης των μεταλλάξεων φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται από το γεωγραφικό υπόβαθρο και την εθνικότητα (Liu et al., 2016).

Διάφορες μελέτες έχουν καταλήξει ότι οι μεταλλάξεις του υποκινητή TERT και η μετάλλαξη BRAF V600E μπορούν να συνυπάρχουν, και όταν συμβαίνει αυτό δημιουργείται ένα μοναδικό γενετικό background, το οποίο οδηγεί σε μία ιδιαίτερη επιθετική παθογένεση και με όχι καλή κλινική έκβαση (Liu et al., 2013; Xing et al., 2013). Σε αυτή τη μελέτη, ασθενείς χωρίστηκαν σε τέσσερις κατηγορίες - σε εκείνους που δεν έχουν μετάλλαξη, σε εκείνους που έχουν μόνο την μετάλλαξη BRAF V600E, σε εκείνους που έχουν μόνο την μετάλλαξη στον υποκινητή TERT και στα άτομα που είχαν και τις δύο μεταλλάξεις.

Οι ασθενείς και με τις δύο μεταλλάξεις είχαν μεγαλύτερη συσχέτιση με σχεδόν όλους τους συντελεστές υψηλού κινδύνου, όπως το μεγάλο μέγεθος του όγκου, μεταστάσεις στους λεμφαδένες, αγγειακή διήθηση, απομακρυσμένες μεταστάσεις και προχωρημένα στάδια καρκίνου III/IV σε σχέση με τις άλλες ομάδες (Xing et al., 2014). Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι και τα ποσοστά θνησιμότητας στους ασθενείς με τις δύο μεταλλάξεις είναι αυξημένα συγκριτικά με τις άλλες κατηγορίες ασθενών που φέρουν μια μόνο μετάλλαξη (Ngeo & Eng., 2014). Ένας ενδεχόμενος μοριακός μηχανισμός που εξηγεί το συνεργικό αποτέλεσμα, της συνύπαρξης των δύο αυτών μεταλλάξεων είναι η ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών από την BRAF V600E που οδηγεί σε αύξηση των μεταγραφικών παραγόντων ETS. Έτσι, οι παράγοντες αυτές μπορούν να συνδεθούν στις θέσεις δέσμευσης στον υποκινητή της TERT που έχουν δημιουργηθεί λόγω των μεταλλάξεων C228T και C250T με αποτέλεσμα να αυξηθεί δραματικά η έκφραση της TERT (Liu et al., 2016).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ερευνάται το ενδεχόμενο συσχέτισης των μεταλλάξεων σε γονίδια RAS όταν συνυπάρχουν με τις μεταλλάξεις του υποκινητή του γονιδίου TERT στον καρκίνο του θυρεοειδούς. Σκοπός αυτών των μελετών είναι να βρεθεί να και σε αυτή τη συνύπαρξη οδηγεί στον ογκογένεση και προάγει επιθετικότητα στον καρκίνο με δυσμενή κλινική έκβαση. Πιθανότερα ο μοριακός μηχανισμός που θα οδηγεί στην ογκογένεση θα έχει να κάνει με τον συνεργατικό ρόλο της RAS με την TERT, μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K διότι οι RAS μεταλλάξεις κατά προτίμηση ενεργοποιούν αυτό το μονοπάτι πάνω από το μονοπάτι MAPK (Xing, 2013).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά

2.1.1. Δείγματα

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν συνολικά 34 ασθενείς που διαγνώστηκαν με καρκίνο του θυρεοειδούς. Τα δείγματα προήλθαν από το Παθολογοανατομικό Τμήμα του Στρατιωτικού Νοσοκομείου ΝΙΜΙΤΣ στην Αθήνα. Τα δείγματα είναι βιοψίες ιστού και περιλαμβάνουν διαφορετικούς τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς. Οι τύποι των ιστών με καρκίνο του θυρεοειδούς που εξετάστηκαν ήταν οι ακόλουθοι : 15 ιστοί με θηλώδες καρκίνωμα (PTC), 13 ιστοί με θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδες πρότυπο ανάπτυξης (FVPTC), 4 ιστοί με θυλακιώδες καρκίνωμα (FTC) και 2 ιστοί με μυελοειδές καρκίνωμα (MTC). Στον Πίνακα 1 δίνονται τα στοιχεία των δειγμάτων που μελετήθηκαν.

Πίνακας 1: Στοιχεία των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Τύπος καρκίνου	Αριθμός δειγμάτων	Φύλο	Ηλικία
Θηλώδες καρκίνωμα	15	13 ΘΗΛΥ 2 ΑΡΡΕΝ	48,6 ± 13,3
Θηλώδες καρκίνωμα θυλακιδώδους τύπου	13	10 ΘΗΛΥ 3 ΑΡΡΕΝ	53,6 ± 14,5
Θυλακιδώδες καρκίνωμα	4	3 ΘΗΛΥ 1 ΑΡΡΕΝ	47,7 ± 18,4
Μυελοειδές καρκίνωμα	2	2 ΘΗΛΥ	62 ± 7

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Απομόνωση DNA από βιοψίες ιστών

2.2.1.1. Αντιδραστήρια – Διαλύματα

Τα αντιδραστήρια και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία απομόνωσης DNA από βιοψία ιστού σταθεροποιημένου με φορμόλη και εγκλεισμένου σε παραφίνη παρουσιάζονται παρακάτω:

- ❖ Ξυλένιο (Sigma-Aldrich)
- ❖ Αιθανόλη (Sigma-Aldrich, καθαρότητας ≥ 99.8%)
- ❖ Kit της εταιρείας QIAGEN QIAamp DNA FFPE Tissue

To kit QIAamp DNA FFPE Tissue περιείχε τα εξής αντιδραστήρια:

- ❖ Διάλυμα πρωτεΐνης K (20 mg/ml)
- ❖ Ρυθμιστικά διαλύματα Buffer ATL, Buffer AL (Lysis Buffer), Wash Buffer AW1 (Wash Buffer 1), Wash Buffer AW2 (Wash Buffer 2), Elution Buffer ATE (Elution Buffer)
- ❖ QIAamp MinElute κολώνες και σωληνάρια συλλογής χωρητικότητας 2 ml

2.2.1.2. Πρωτόκολλο απομόνωσης

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από βιοψίες ιστών χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία: αρχικά, με την χρήση αποστειρωμένου νυστεριού αφαιρέθηκε η περίσσεια ποσότητα παραφίνης από κάθε δείγμα. Έπειτα ο κάθε ιστός τεμαχίστηκε σε μία έως δύο τομές (ανάλογα με την ποσότητα του ιστού σε κάθε δείγμα) πάχους 5-10 μm . Στη συνέχεια οι τεμαχισμένοι ιστοί τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια eppendorf του 1.5 ml, ακολούθησε η προσθήκη 1 ml ξυλένιου και μετέπειτα ισχυρή ανάδευση με την χρήση vortex για δέκα δευτερόλεπτα.

Η διαδικασία συνεχίστηκε με φυγοκέντρηση των δειγμάτων στην φυγόκεντρο (HERAEUS PICO17 Centrifuge) σε πλήρη ταχύτητα (16.600 x g) για δύο λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έτσι, η παραφίνη διαλύθηκε στο ξυλένιο και ήταν ευκολότερη η απομάκρυνση της από τον ιστό του δείγματος. Το υπερκείμενο, μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, αφαιρέθηκε με την χρήση πιπέτας ώστε το ίζημα να παραμείνει αναλλοίωτο.

Στην συνέχεια προστέθηκε στο ίζημα 1 ml αιθανόλης (καθαρότητας $\geq 99.8\%$) με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας ξυλένιου. Ακολούθησε έντονη ανάδευση με χρήση vortex για δέκα δευτερόλεπτα και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε πλήρη ταχύτητα (16.600 x g) για δύο λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε η απομάκρυνση του υπερκείμενου και το κάθε δείγμα (ίζημα) επώαστηκε, με ανοικτό καπάκι, σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C βαθμούς για περίπου είκοσι λεπτά, μέχρι να εξατμιστούν πλήρως τα υπολείμματα αιθανόλης.

Έπειτα το ίζημα επαναιωρείται πλήρως σε 180 μl κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος ATL (Buffer ATL), πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 μl πρωτεΐνης K (20 mg/ml) και στην συνέχεια τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ισχυρή ανάδευση για δέκα δευτερόλεπτα με τη χρήση vortex. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων σε θερμικό περιστρεφόμενο επωαστήρα (rotating incubator) με εσωτερική θερμοκρασία 56 °C βαθμών για τουλάχιστον δύο ώρες και είκοσι λεπτά, μέχρι να επέλθει η πλήρης λύση του κάθε δείγματος. Συγκεκριμένα, κάποια δείγματα χρειάστηκε να μείνουν στο στάδιο της επώασης καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας (24 ώρες, overnight) ενώ σε κάποια από αυτά χρειάστηκε επιπλέον προσθήκη 10 έως 20 μl πρωτεΐνης K, εφόσον το δείγμα δεν είχε λυθεί πλήρως μετά την επώαση.

Μετά την πλήρη λύση τα δείγματα επώαστηκαν στους 90 °C βαθμούς για χρονικό διάστημα μίας ώρας σε μπλοκ θέρμανσης (heating block). Ύστερα από μία ήπια

φυγοκέντρωση (quick spin), προστέθηκαν 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος AL (Buffer AL) και 200 μl αιθανόλης. Ακολούθησε καλή ανάμειξη του δείγματος με την χρήση vortex μετά την κάθε προσθήκη. Έπειτα, μετά από μία ήπια φυγοκέντρωση, όλο το κυτταρόλυμα μεταφέρθηκε προσεκτικά στην ειδική στήλη έκλουσης QIAamp MinElute, η οποία εισήχθη εκ των προτέρων σε ειδικό σωλήνα συλλογής των 2 ml (collection tube).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση της ειδικής στήλης, σε ταχύτητα 6000 x g για ένα λεπτό, με σκοπό την δέσμευση του γενωμικού DNA στην μεμβράνη της στήλης με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προσμίξεων διαμέσου μεμβράνης, που συλλέγονταν στο σωλήνα συλλογής. Μετά την φυγοκέντρωση, η ειδική στήλη έκλουσης μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα συλλογής των 2 ml.

Ο περαιτέρω καθαρισμός του DNA, που έχει δεσμευθεί στη μεμβράνη, επιτεύχθηκε μέσω της προσθήκης 500 μl AW1 διαλύματος έκλουσης (Buffer AW1) στη στήλη και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 6200 x g για ένα λεπτό. Έπειτα η στήλη μεταφέρθηκε σε καινούριο σωλήνα συλλογής και έγινε προσθήκη 500 μl διαλύματος πλύσης AW2 (Buffer AW2) και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 6200 x g για ένα λεπτό και στο τέλος της φυγοκέντρωσης μεταφορά της στήλης σε νέο σωλήνα συλλογής. Απαραίτητο βήμα, αφότου ολοκληρώθηκε η διαδικασία της πλύσης του DNA ήταν μια νέα φυγοκέντρωση της στήλης σε πλήρη ταχύτητα (16.600 x g), για τρία λεπτά, ώστε να στεγνώσει πλήρως η μεμβράνη. Έπειτα, η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα erpendorf του 1,5 ml και ακολούθησε το τελικό στάδιο έκλουσης του DNA, κατά το οποίο προστέθηκαν στο κέντρο της μεμβράνης 25 μl ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης ATE (Buffer ATE) και η στήλη επωάστηκε για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το τελευταίο βήμα της διαδικασίας απομόνωσης περιελάμβανε μία φυγοκέντρωση σε πλήρη ταχύτητα (16.600 x g) για ένα λεπτό, με σκοπό την τελική έκλυση του DNA από τη στήλη. Το γενωμικό DNA των δειγμάτων αποθηκεύεται και συντηρείται σε ψυγείο στους -20 °C για μετέπειτα μελλοντική χρήση.

2.2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

2.2.2.1. Αντιδραστήρια-Διαλύματα

Για την ηλεκτροφόρηση των νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- ❖ TAE 50X (stock): Tris-base (242 gr), οξικό οξύ (57.1 ml), EDTA (18.6 gr), ddH₂O μέχρι ένα L. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στην τιμή 8 με την προσθήκη HCl.

- ❖ Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr): Υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml

- ❖ Διάλυμα φόρτωσης (Loading Buffer, 6X) : 0.25% Μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromofenol Blue), 30% W/V γλυκερόλη σε ddH₂O.

- ❖ Αγαρόζη

Μάρτυρας μοριακών μεγεθών DNA: Low Molecular DNA Ladder (500 μl/ml) της εταιρείας New England Biolabs

2.2.2.2. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική, σχετικά γρήγορη και απλή. Χρησιμοποιείται ιδιαίτερα για την ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων, για τον έλεγχο της καθαρότητας αλλά και της απομόνωσης των βιομορίων, όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα, αλλά και πεπτιδίων, αμινοξέων, σακχάρων, ενζύμων, ισοενζύμων κ.α.

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού, κατά την οποία φορτισμένα μόρια μετακινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου στο εσωτερικό πηκτωμάτων ή διαλυμάτων. Πολλά βιομόρια περιέχουν ομάδες που μπορούν να ιονισθούν και έτσι σε υδατικά διαλύματα βρίσκονται ως κατιόντα ή ανιόντα ανάλογα με το καθαρό φορτίο που φέρουν. Όταν τα μόρια αυτά βρεθούν σε ένα ηλεκτρικό πεδίο θα μετακινηθούν προς το θετικό ή αρνητικό πόλο με μία ταχύτητα η οποία εξαρτάται από το φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα του μορίου, την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, τις ιδιότητες του μέσου στήριξης και την θερμοκρασία.

Η αγαρόζη εξάγεται με την μορφή άγαρ από διάφορα είδη κόκκινων θαλάσσιων φυκών, που βρίσκονται στην Καλιφόρνια και την ανατολική Ασία. Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές, που αποτελείται από την επανάληψη των μονομερών μονάδων αγαροβιόζης. Η αγαροβιόζη είναι ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από D – γαλακτόζη και 3,6 – ανυδρο – L – γαλακτοπυρανόζης. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί μια πολύ συχνή μέθοδος ποιοτικής (αλλά και ποσοτικής) ανάλυσης του DNA, όπου γραμμικά μόρια DNA κινούνται προς την άνοδο (λόγω των αρνητικών φορτίων των φωσφορικών ομάδων του μορίου) με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το βάρος τους (π.χ. ένα θραύσμα DNA μεγέθους 100 ζευγών βάσεων (bp) θα κινηθεί ταχύτερα από ένα μεγέθους 500 bp) (Magdeldin, 2012).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί, ότι ο ρυθμός της κινητικότητας του DNA εξαρτάται από την στερεοδιάταξή του αλλά και από την συγκέντρωση της αγαρόζης. Συγκεκριμένα η ποσοστιαία συγκέντρωση του πηκτώματος και η ταχύτητα κίνησης είναι μεγέθη που σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα. Έτσι, αυξάνοντας την συγκέντρωση αγαρόζης, μειώνεται η ταχύτητα μετανάστευσης των τμημάτων αλλά επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των μικρότερων τμημάτων. Αντίθετα, μειώνοντας την συγκέντρωση της αγαρόζης επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός μεγαλύτερων τμημάτων (Lee et al., 2012). Επιπλέον, όταν ένα μόριο είναι κυκλικό τότε εκτός από το βάρος του παίζει ρόλο και η διαμόρφωσή του, η υπερελικωμένη μορφή κινείται ταχύτερα από την χαλαρή γιατί είναι πιο συμπιεσμένη και περνά πιο εύκολα μέσα από τα κενά του πολυμερούς. Σε υψηλότερα ποσοστά αγαρόζης (2%) συμβαίνει το αντίθετο γιατί τα κενά είναι πολύ μικρότερα και η χαλαρή μορφή ως πιο ευέλικτη μπορεί να κινηθεί ταχύτερα (Magdeldin, 2012).

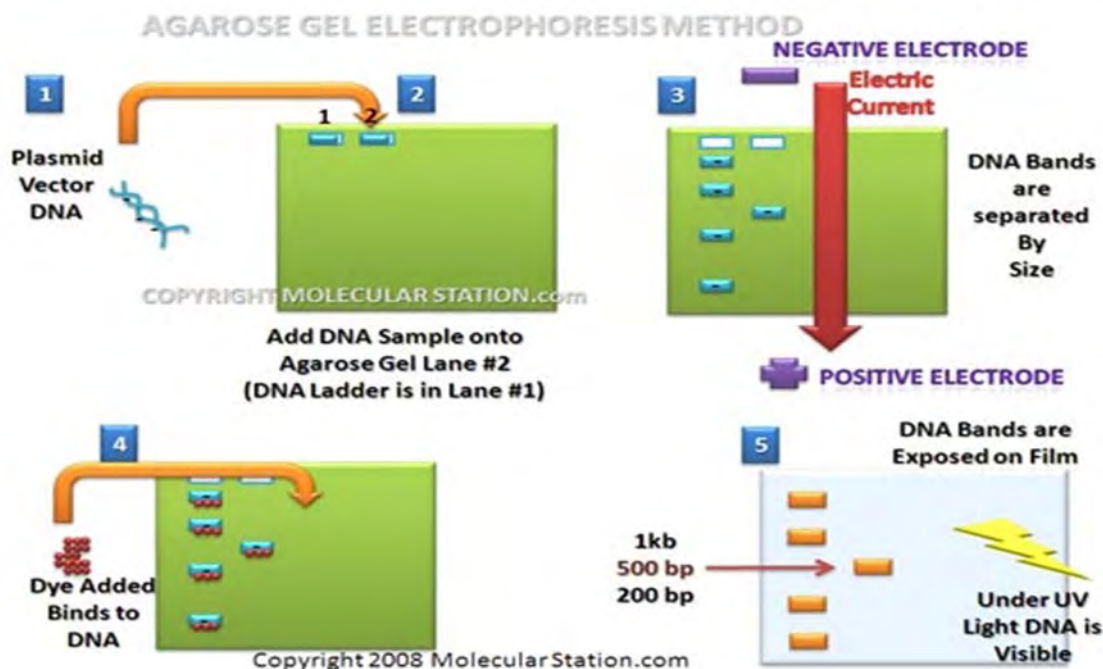
Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία δημιουργίας ενός πηκτώματος αγαρόζης με ποσοστιαία περιεκτικότητα 1,5% σε αγαρόζη ήταν η ακόλουθη: αρχικά, ζυγίστηκαν 0,9 gr αγαρόζης, με την βοήθεια ειδικού ζυγού ακριβείας και μεταφέρθηκαν σε μία κωνική φιάλη, στην οποία προστέθηκαν 60 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE (Tris/Acetate/EDTA) 1X. Προκειμένου να διαλυθεί η αγαρόζη, η κωνική φιάλη τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων, για χρονικό διάστημα περίπου δύο λεπτών και παραμένει σε υγρή μορφή σε θερμοκρασία έως 40 °C. Αφού το μείγμα κρυώσει υπό τρεχούμενο νερό βρύσης, ακολουθεί η προσθήκη 2,16 μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml. Έπειτα από καλή ανάδευση, το δείγμα μεταφέρθηκε σε ειδικό καλούπι, έτσι ώστε να αποκτήσει κατάλληλο σχήμα, μέχρι η αγαρόζη να πολυμεριστεί και να πήξει. Στο σημείο αυτό, πριν πολυμεριστεί η αγαρόζη, στο καλούπι τοποθετούνται ειδικά χτενάκια, τα οποία βοηθούν στο σχηματισμό των ονομαζόμενων “wells” ή αλλιώς “πηγαδάκια”, στα οποία φορτώνονται, στη συνέχεια, τα υπό εξέταση δείγματα. Μετά την πήξη του πηκτώματος, αφαιρέθηκαν τα χτενάκια και το πήκτωμα τοποθετήθηκε στην ειδική συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, η οποία ήταν γεμάτη με διάλυμα TAE 1X (παρέχει τα απαραίτητα ιόντα για να πραγματοποιείται η μεταφορά του ρεύματος και να διατηρείται το pH σε μια σχετικά σταθερή τιμή).

Πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης, απαιτείται η ανάμειξη του δείγματος με ένα διάλυμα φόρτωσης ή Loading Buffer. Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης και γλυκερόλη. Το μπλε της βρωμοφαινόλης είναι μία χρωστική ιχνηλασιμότητας χαμηλού μοριακού βάρους με αρνητικό φορτίο, η οποία είναι ορατή στο φυσικό φως, καθιστώντας τα δείγματα ορατά, γεγονός που διευκολύνει την τοποθέτηση των δειγμάτων στο πήκτωμα ενώ παράλληλα επιτρέπει τον έλεγχο της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Η γλυκερόλη, αυξάνει την πυκνότητα του δείγματος ώστε να διευκολυνθεί η εισαγωγή τους στο “πηγαδάκι” και να μη διαχυθεί στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Watson et al., 2007). Μαζί με τα δείγματα είναι απαραίτητη και η φόρτωση ενός μάρτυρα μοριακών μεγεθών DNA (Low Molecular DNA Ladder), του οποίου τα μεγέθη των ζωνών είναι γνωστά και σύμφωνα με αυτά υπολογίζεται το μοριακό βάρος των τμημάτων DNA (Chen et al., 2009).

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης αποτελείται από μία πηγή ηλεκτρικού ρεύματος (τροφοδοτικό), που παρέχει συνεχές ρεύμα, με ρυθμιζόμενη τάση (volts) ή ένταση (mA), και από μία λεκάνη χωρισμένη σε δύο δεξαμενές (λουτρό), που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα. Στη μία δεξαμενή είναι προσαρμοσμένο στην μία πλευρά το θετικό και στην άλλη το αρνητικό ηλεκτρόδιο. Η εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί την ροή του ηλεκτρικού ρεύματος από το αρνητικό ηλεκτρόδιο – ρυθμιστικό διάλυμα – υλικό ηλεκτροφόρησης – ρυθμιστικό διάλυμα – θετικό ηλεκτρόδιο (Voytas, 2001) και τον σχηματισμό των χαρακτηριστικών ζωνών (ανάλογα με το μέγεθος τους). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με ρυθμιζόμενη τάση στα 80 έως 100 volt

και μετά το πέρας της διαδικασίας το πήκτωμα αγαρόζης εκτίθεται σε υπεριώδες φως (UV), ώστε να απεικονιστεί το αποτέλεσμα.



Εικόνα 13: Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης
<http://www.molecularstation.com/images/agarose-gel-electrophoresis.jpg>

2.2.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Αρχή μεθόδου

Η ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) από τον Karry Mullis το 1983 άλλαξε ριζικά τις βιολογικές επιστήμες. Η τεχνική της PCR αυτή τη στιγμή χρησιμοποιείται ευρέως από κλινικούς ιατρούς και ερευνητές για τη διάγνωση ασθενειών, κλώνων και αλληλουχιών γονιδίων και διεξάγει εκλεπτυσμένες ποσοτικές και γονιδιακές μελέτες με γρήγορο και πολύ ευαίσθητο τρόπο. Κάθε ανάλυση PCR απαιτεί την παρουσία εκμαγείου DNA, εκκινητών, νουκλεοτιδίων και DNA πολυμεράσης. Η DNA πολυμεράση είναι το βασικό ένζυμο που συνδέει μεμονωμένα νουκλεοτίδια και για την παραγωγή των προϊόντων της PCR κυρίως χρησιμοποιείται η Taq πολυμεράση που απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus Aquaticus* που ζει σε θερμές πηγές σε θερμοκρασίες 70 – 75 °C. Τα νουκλεοτίδια περιλαμβάνουν τις τέσσερις βάσεις - αδερίνη, θυμίνη, κυτοσίνη και γουανίνη (A, T, C, G) που βρίσκονται στο DNA. Αυτά λειτουργούν ως δομικά στοιχεία που χρησιμοποιούνται από την DNA πολυμεράση για τη δημιουργία του προκύπτοντος προϊόντος PCR (Ausubel et al., 2003).

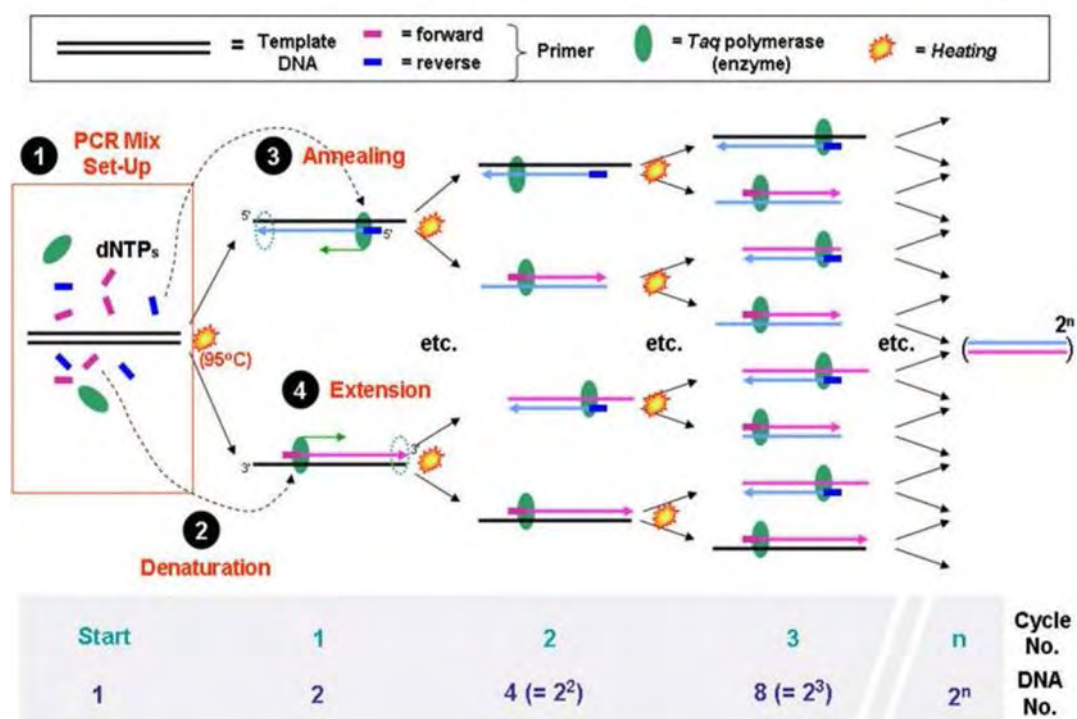
Η PCR βασίζεται στον ενζυματικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οροθετείται δεξιά και αριστερά από δύο εκκινητές – ολιγονουκλεοτίδια (primers), χρησιμοποιώντας επαναλαμβανόμενους κύκλους σύνθεσης DNA. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς την μία

από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA – εκμαγείου. Η απόσταση μεταξύ των εκκινητών καθορίζεται συνήθως εμπειρικά και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Συνήθως το μέγεθος του τμήματος DNA που χρησιμοποιείται για διαγνωστικές εξετάσεις είναι μεταξύ 100 – 1000 βάσεις νουκλεοτιδίων (Ausubel et al., 2003).

Η διαδικασία της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους. Συνήθως, απαιτούνται 20 – 40 θερμοκρασιακές αλλαγές, οι οποίες μπορούν να ταξινομηθούν σε τρία στάδια (Εικόνα 14) :

1. Το στάδιο της αποδιάταξης του DNA εκμαγείου (denaturation) στους 94-96 °C.
2. Σύνδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλυσίδες (primer annealing).
3. Επέκταση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση του DNA με κατεύθυνση 5'-3' (extension) στους 72°C.

Τα βήματα αναλύονται ακολούθως.



Εικόνα 12: Τα στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

1. Κατά το πρώτο στάδιο της αποδιάταξης, πραγματοποιείται η μετουσίωση του DNA στόχου. Αυτό επιτυγχάνεται κάτω από κατάλληλες θερμοκρασίες, συνήθως στους 94 – 96 °C, μια θερμοκρασία η οποία ευνοεί τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν τις δύο αλυσίδες της διπλής έλικας με αποτέλεσμα την μετατροπή του δίκλωνου DNA σε μονόκλωνο. Η θερμοκρασία στην οποία το δίκλωνο DNA γίνεται μονόκλωνο καλείται σημείο τήξης (melting temperature – T_m). Η θερμοκρασία τήξης επηρεάζεται από τη σύσταση του DNA (περιεκτικότητα σε αζωτούχες βάσεις γουανίνης και κυτοσίνης). Στο ανθρώπινο DNA η θερμοκρασία τήξης είναι περίπου 95 °C.

2. Στο δεύτερο στάδιο, η θερμοκρασία μειώνεται στους 50 – 60 °C με συνέπεια την μερική επανασύνδεση των μονόκλωνων μορίων του DNA-στόχου, όπως και την πρόσδεση των εκκινητικών μορίων στις συμπληρωματικές αλληλουχίες. Η θερμοκρασία είναι γνωστή ως θερμοκρασία επαναδιάταξης T_a (annealing temperature) και είναι κατά κανόνα 5 – 10 °C χαμηλότερη της θερμοκρασίας τήξεως (T_m) των εκκινητών. Ο σχεδιασμός και η επιλογή ενός ειδικού εκκινητή αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιτυχία της αντίδρασης PCR.

3. Στο τρίτο στάδιο, η θερμοκρασία ανέρχεται στους 72 °C και αρχίζει η σύνθεση του DNA, με την δράση της Taq πολυμεράσης, παρουσία ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος και ιόντων Mg^{2+} . Σε αυτή την θερμοκρασία η Taq πολυμεράση προσθέτει 35 – 100 δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) κάθε δευτερόλεπτο, με προσανατολισμό 5' – 3', τα οποία είναι συμπληρωματικά στο υπόστρωμα. Μετά από κάθε κύκλο, οι συντιθέμενοι κλώνοι του DNA χρησιμεύουν ως εκμαγείο στον επόμενο κύκλο. Το κύριο προϊόν αυτής της εκθετικής αντίδρασης είναι ένα τμήμα του δίκλωνου DNA, του οποίου τα άκρα ορίζονται από τους εκκινητές και το μήκος του από την μεταξύ τους απόσταση.

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ειδικούς ξερούς επωαστήρες που ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές (thermal cycler), οι οποίοι εναλλάσσουν την θερμοκρασία (θέρμανση – ψύξη) βάση προγραμματισμού.

Τα πλεονεκτήματα της PCR είναι ότι παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένου τμήματος του DNA σε μικρό χρονικό διάστημα. Επιπλέον, η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί με την χρήση ελάχιστης ποσότητας γενωμικού DNA, καθώς και με DNA που δεν είναι εξαιρετικής ποιότητας (σπασμένου ή ακάθαρτου).

Πειραματική διαδικασία

Οι περιοχές του γονιδίου TERT του χρωμοσώματος 5 που ενισχύθηκαν με τη διαδικασία της PCR, ήταν οι περιοχές που περιλαμβάνουν τις μεταλλάξεις C228T, C250T και CC242-243TT. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των παραπάνω περιοχών, καθώς και το μέγεθος του προϊόντος και οι υπό μελέτη σημειακές μεταλλάξεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των σημειακών μεταλλάξεων του γονιδίου TERT και το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος της PCR.

Γονίδιο	Αλληλουχία Εκκινητή 5'-3'	Μεταλλάξεις	Μέγεθος προϊόντος
TERT	FOR*: -	C228T	194bp
	CACCCGTCCTGCCCTTCACCTT-	C250T	
	REV*: -	CC242-243TT	
	GGCTTCCACGTGCGCAGCAGGA-		
*For : (forward primer, πρόσθιος εκκινητής), *Rev:(reverse primer, ανάστροφος εκκινητής).			

Οι θερμοκρασιακές εναλλαγές διεξήχθησαν στον ειδικό θερμοκυκλοποιητή (SENSQUEST lab cycler) και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Συνθήκες θερμοκυκλοποιητή που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR.

Στάδιο		
	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 λεπτά
Αποδιάταξη	95°C	30 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	62°C	1 λεπτό
Επέκταση	72°C	30 δευτερόλεπτα
Επέκταση	72°C	7 λεπτά
Αναμονή	4°C	απεριόριστος χρόνος

40
κύκλοι

Σε όλα τα στάδια (αποδιάταξη, υβριδοποίηση και επέκταση) χρησιμοποιήθηκαν 40 κύκλοι. Στην εργασία η αντίδραση πραγματοποιούνταν σε όγκο 50 μl σε ειδικό σωληνάριο erppendorf τελικού όγκου 0,2 ml. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση της PCR αγοράστηκαν από την Kara Biosystems (KAPA Taq PCR kit) και παρατίθενται στον Πίνακα 5. Επίσης, σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε και ένα αρνητικό δείγμα ελέγχου (negative control), που περιείχε όλα τα συστατικά μιας αντίδρασης PCR, της οποίας το γενωμικό DNA αντικαταστάθηκε με νερό. Στο δείγμα αυτό δεν αναμένεται να εμφανιστεί προϊόν, καθώς δεν περιέχει DNA, σε περίπτωση που εμφανιστεί προϊόν αυτό αποτελεί

σημάδι επιμόλυνσης τουλάχιστον σε ένα από τα αντιδραστήρια της PCR ή μη ειδικής ενίσχυσης του υπό μελέτη γονιδίου κατά την διάρκεια της αντίδρασης.

Πίνακας 5: Ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
Buffer x10 + MgCl 15mM	5
dNTPs 10mM	1
MgCl ₂ 25mM	2
Primer Forward 10 pmol/μl	2,5
Primer Reverse 10pmol/μl	2,5
DMSO 5%	2,5
K-Taq Polymerase (5 u/μl)	0,2
DNA	2
H ₂ O	32.3
Συνολικός Όγκος	50

Παρακάτω εικονίζεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου TERT, όπου με πράσινο χρώμα επισημάνεται ο πρόσθιος εκκινητής, με κόκκινο χρώμα ο ανάστροφος εκκινητής και με μπλε χρώμα οι υπό μελέτη σημειακές μεταλλάξεις

Πίνακας 6: Αλληλουχία γενωμικού DNA του γονιδίου TERT

```
GCGCGGGCGGGGAAGCGCGGCCAGACCCCCGGGTCCGCCCGGAGCAGCTGCGCTGTCG
GGGCCAGGCCGGGCTCCCAGTGGATTGCGGGGCACAGACGCCAGGACCGCGCTTCCCAC
GTGGCGGAGGGACTGGGGACCCGGGACCCGTCCTGCGCCCTTCCAGCTCCGCCTC
CTCCGCGCGGACCCCGCCCCGTCCCGACCCCTCCCGGGTCCCGGCCAGCCCCCTCCGGG
CCCTCCAGCCCCCTCCCTTCTTCCGCGGCCCGCCCTCTCCTCGCGGCGCGAGTTTCCAG
GCAGCGCTGCGTCTCTGCTGCGACGTGGGAAGCCCTGGCCCCGGCCACCCCGCGATGCC
GCGCGCTCCCGCTGCCGAGCCGTGCGCTCCCTGCTGCGCAGCCACTACCGCGAGGTGCTG
CCGCTGGCCACGTTTCG
```

Στην συνέχεια, τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης σύστασης 1,5% ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της αντίδρασης. Στα πηγαδάκια «φορτώθηκαν» 5 μl από το προϊόν της αντίδρασης PCR μετά από ανάμειξη με 2 μl χρωστικής-διαλύματος φόρτωσης και 5 μl H₂O. Στο πήκτωμα φορτώθηκε και μάρτυρας μοριακού βάρους (Low MW DNA Ladder). Η απεικόνιση του αποτελέσματος πραγματοποιήθηκε με την τοποθέτηση του πηκτώματος κάτω από την ειδική λάμπα UV.

2.2.4. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Πρωτόκολλο

Προκειμένου να επιτευχθεί η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR πρέπει εκ των προτέρων να γίνει ο καθαρισμός τους, έτσι ώστε να αφαιρεθούν τα υπολείμματα αλάτων, ενζύμων, διμερή εκκινητών που έχουν παραμείνει από τις ενζυματικές αντιδράσεις. Ο καθαρισμός του προϊόντος της PCR έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή της εταιρίας MACHEREY-NAGEL, NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up.

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: αρχικά, προσαρμόστηκε ο όγκος των δειγμάτων στα 50 μl, με προσθήκη απεσταγμένου νερού. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος NT1. Σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου, η αναλογία του ρυθμιστικού διαλύματος προς το δείγμα είναι 2:1, για κάθε έναν όγκο δείγματος προσθέτουμε 2 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος, έτσι για κάθε 50 μl του PCR προϊόντος προστέθηκαν 100 μl διαλύματος NT1. Έπειτα, ακολούθησε η δέσμευση του DNA στην μεμβράνη της ειδικής στήλης. Για το σκοπό αυτό, τοποθετήθηκε σε κάθε σωλήνα συλλογής (collection tube) των 2 ml μία στήλη έκλουσης και έπειτα προσεκτικά φορτώθηκε όλη η ποσότητα δείγματος στο κέντρο την μεμβράνης. Μετά από φυγοκέντρηση της στήλης, σε ταχύτητα 11,000 x g για 30 δευτερόλεπτα, αφαιρέθηκε το απορρέων υγρό και η στήλη επανατοποθετήθηκε στο collection tube. Επόμενο βήμα ήταν η έκλουση της μεμβράνης πυριτίου (silica membrane). Έτσι, προστέθηκαν στη στήλη 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 11,000 x g για 30 δευτερόλεπτα. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης αφαιρέθηκε το απορρέων υγρό από το collection tube. Η διαδικασία έκλουσης της μεμβράνης, πραγματοποιήθηκε και για δεύτερη φορά καθώς συνίσταται από τον κατασκευαστή. Τελικά η στήλη φυγοκεντρήθηκε σε ταχύτητα 11,000 x g για ένα λεπτό, ώστε να επιτευχθεί η πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης, που περιλαμβάνεται στο ρυθμιστικό διάλυμα NT3, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε παρεμπόδιση ενζυματικών αντιδράσεων. Για την έκλουση των προϊόντων της PCR η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο erppendorf σωλήνα (χωρητικότητας 1,5 ml) και ακολούθησε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης NE (elution buffer NE). Οι όγκοι έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν κυμαίνονται μεταξύ 15 μl – 25 μl, ανάλογα με την ποσότητα του κάθε προϊόντος PCR, οι οποίοι αποφασίστηκαν ανάλογα με την ένταση της ζώνης που προέκυψε από την εικόνα της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα 1,5% αγαρόζης. Πραγματοποιήθηκε επώαση του διαλύματος έκλουσης στις στήλες, για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου (18 ° -25 °C) και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 11,000 x g για ένα λεπτό. Τέλος, τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 1,5% για την εκτίμηση της συγκέντρωσής τους και διατηρήθηκαν σε καταψύκτη θερμοκρασίας -20°C μέχρι την αλληλούχισή τους.

2.2.5. Αλληλούχιση των καθαρισμένων προϊόντων της PCR

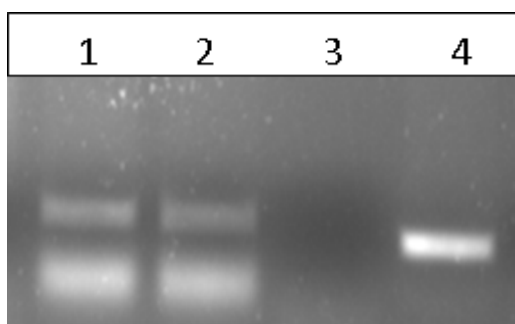
Η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR εκτελέστηκε από μία εξειδικευμένη εταιρεία βιοτεχνολογικών και μοριακών τεχνικών με την επωνυμία CEMIACA (Cellular and Molecular Immunological Applications) (Λάρισα). Τα αποτελέσματα των αλληλουχίσεων στάλθηκαν υπό μορφή χρωματογραφημάτων, τα οποία αναλύθηκαν στο εργαστήριο με την βοήθεια του εξειδικευμένου λογισμικού προγράμματος BioEdit v7.2.5 (developer Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad CA92008).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι για την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκαν τόσο οι πρόσθιοι όσο και οι ανάστροφοι εκκινητές του Πίνακα 2.

3. Αποτελέσματα – Συζήτηση

3.1. Ενίσχυση της υπό μελέτη περιοχής του γονιδίου TERT με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

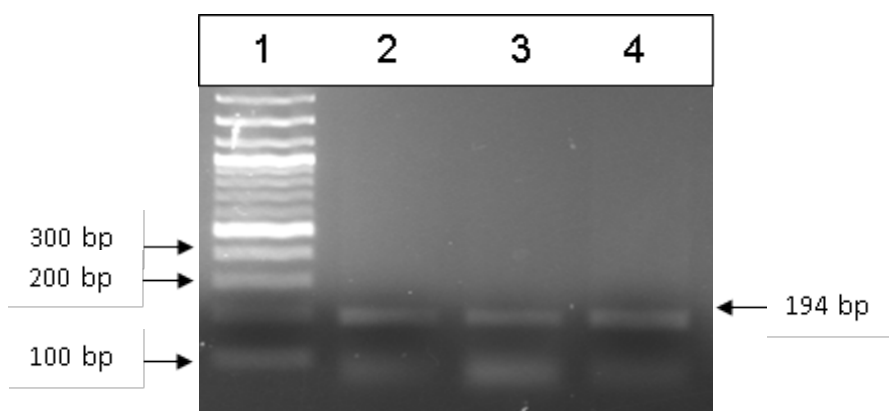
Το γενωμικό DNA που απομονώθηκε από βιοψίες ιστών ενισχύθηκε με την χρήση κατάλληλων εκκινητών στην περιοχή του γονιδίου TERT με την μέθοδο τις αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Ενδεικτικά, στην εικόνα 13 απεικονίζονται τα προϊόντα ενίσχυσης με PCR της επιθυμητής περιοχής διαφορετικών δειγμάτων για τις μεταλλάξεις C228T, CC242-243TT και C250T αντίστοιχα.



Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% της περιοχής που περιλαμβάνει τις μεταλλάξεις του γονιδίου TERT μετά από ενίσχυση διαφορετικών DNA με αντίδραση PCR. Διαδρομή 5: Δείγμα DNA 245 bps. Διαδρομές 1-3 & 6-7: Ενίσχυση γενωμικού DNA των δειγμάτων 8, 15, 52, 44, 45. Διαδρομές 4&8: Δείγμα αρνητικού μάρτυρα έλεγχου της αντίδρασης PCR.

3.2. Καθαρισμός προϊόντων της PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR πραγματοποιείται με σκοπό την βέλτιστη αλληλούχιση για την ανάλυση των μεταλλάξεων του γονιδίου TERT. Με την διαδικασία αυτή, απομακρύνονται υπολείμματα εκκινητών, δεοξυνουκλεοτιδίων και μη ειδικά προϊόντα της PCR. Στην εικόνα 14 παραθέτονται ορισμένα από τα καθαρισμένα προϊόντα PCR.

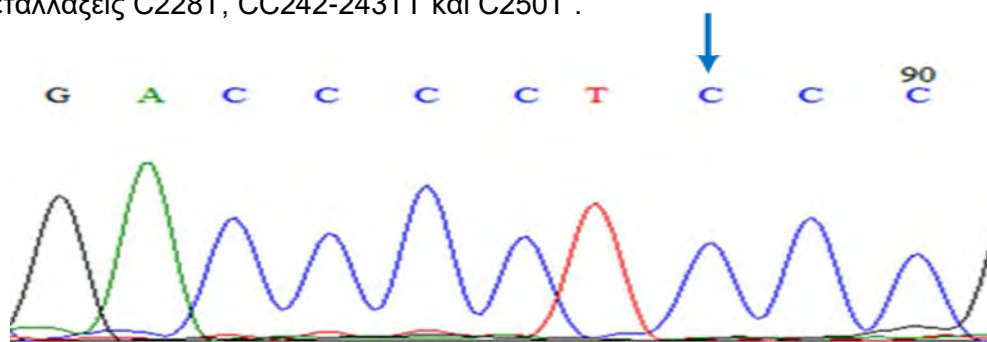


Εικόνα 14: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των προϊόντων ενίσχυσης της περιοχής που περιλαμβάνει τις μεταλλάξεις του υποκινητή του γονιδίου TERT μετά από καθαρισμό τους. Διαδρομή 1: Δείκτης μοριακών μεγεθών, 2-Log DNA Ladder (100-1000 bq). Διαδρομές 2-4: Καθαρισμένα προϊόντα ενίσχυσης του γενωμικού DNA των δειγμάτων 30, 32 και 36.

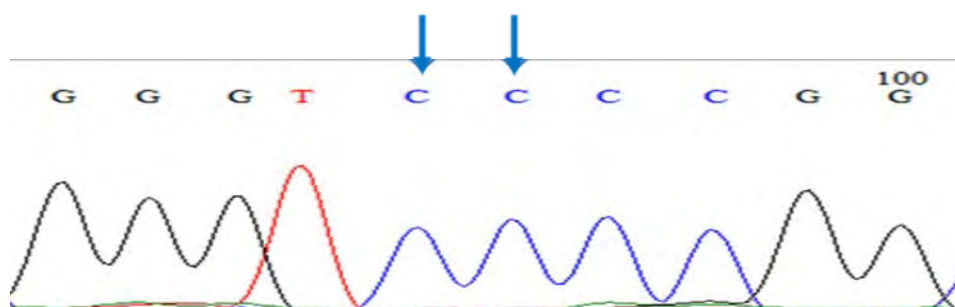
3.3. Αλληλούχιση των προϊόντων της PCR

Τα προϊόντα της PCR αλληλουχήθηκαν και τα αποτελέσματα αυτών εμφανίζονται σε μορφή χρωματογραφήματος. Η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR έδωσε 97-100% ομολογία με τις υπό μελέτη περιοχές του γονιδίου TERT, μετά από ευθυγράμμιση με το πρόγραμμα BioEdit.

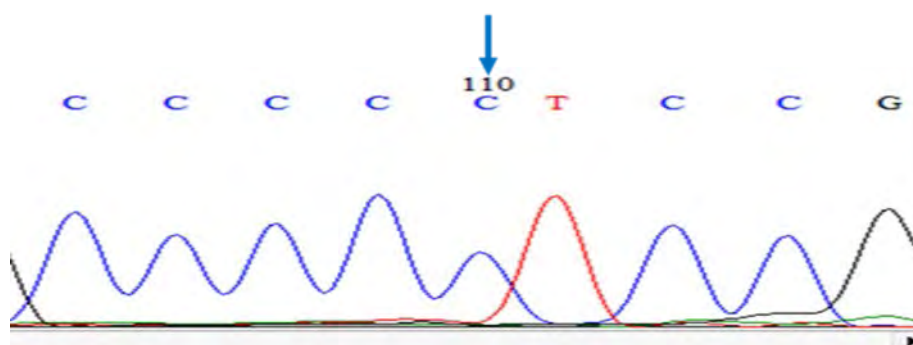
Στις εικόνες 15-18 απεικονίζονται ορισμένα από τα χρωματογραφήματα τα οποία εστιάζονται κυρίως στις περιοχές του γονιδίου TERT που περιλαμβάνει τις μεταλλάξεις C228T, CC242-243TT και C250T.



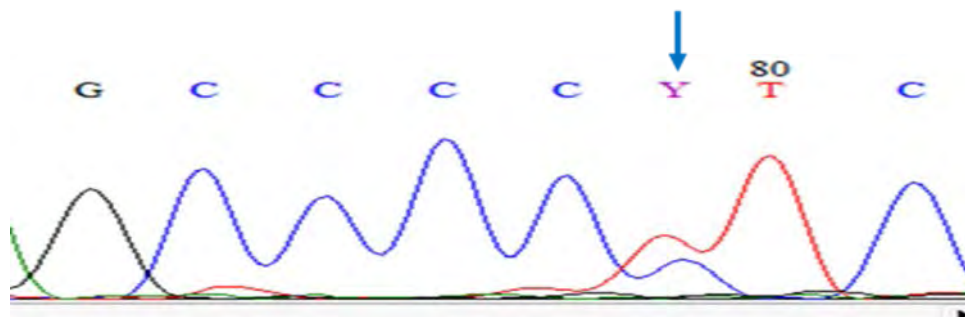
Εικόνα 15: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου TERT για το δείγμα 21. Με βέλος σημειώνεται η βάση που συναντάται στην περιοχή του υποκινητή στη θέση -146 bp (C250T). Η παρουσία της κυτοσίνης δηλώνει την απουσία μετάλλαξης.



Εικόνα 16: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου TERT για το δείγμα 21. Με βέλος σημειώνεται οι βάσεις που συναντώνται στις θέσεις -139 bp και -138 bp (C243T & C242T). Η παρουσία κυτοσίνης δηλώνει την απουσία μετάλλαξης στο συγκεκριμένο δείγμα.



Εικόνα 17: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου TERT για το δείγμα 21. Με βέλος σημειώνεται η αζωτούχος βάση που συναντάται στην περιοχή του υποκινητή στη θέση -124 bp (C228T). Η παρουσία της κυτοσίνης δηλώνει την απουσία μετάλλαξης στο συγκεκριμένο δείγμα.



Εικόνα 18: Χρωματογράφημα της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου TERT για το δείγμα 4. Με βέλος σημειώνεται η αζωτούχος βάση που συναντάται στη θέση -124 bp (C228T). Η ταυτόχρονη παρουσία της θυμίνης και της κυτοσίνης δηλώνει την παρουσία μετάλλαξης στο συγκεκριμένο δείγμα.

Στην παρούσα εργασία δεν ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις στις θέσεις C250T, C243T και C242T σε κανένα από τα εξεταζόμενα δείγματα. Μόνο η μετάλλαξη στη θέση C228T ταυτοποιήθηκε σε 1 από τα 34 δείγματα που μελετήθηκαν. Η μετάλλαξη αυτή βρίσκεται σε ετεροζυγωτία.

3.4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία δεν ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου TERT στις θέσεις C250T, C243T και C242T σε κανένα από τα δείγματα που εξετάστηκαν. Όσον αφορά την μετάλλαξη στη θέση C228T ταυτοποιήθηκε ένα δείγμα, που φέρει την αλλαγή κυτοσίνης σε θυμίνη σε ετεροζυγωτία. Το δείγμα που φέρει αυτή τη μετάλλαξη είναι ένα θηλώδες καρκίνωμα μιας ασθενούς ηλικίας 72 ετών. Οι μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου TERT έχουν συσχετιστεί με ασθενείς με προχωρημένη ηλικία, και το εύρημα της παρούσας εργασίας συμφωνεί με τη βιβλιογραφία (Liu et al. 2014). Η μετάλλαξη ανιχνεύθηκε σε ένα όγκο με μέγεθος > 40 mm και επιπλέον εμφάνισε μετάσταση σε λεμφαδένες. Αυτή η κλινική εικόνα συνάδει με επιθετικότητα του συγκεκριμένου καρκινώματος. Επιπλέον, η μετάλλαξη C228T που ταυτοποιήθηκε στην εργασία αυτή είναι η πιο συχνή μετάλλαξη του υποκινητή της τελομεράσης στον καρκίνο του θυρεοειδούς, όπως έχει δείξει από άλλες μελέτες (Xing et al., 2014). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η συχνότητα των μεταλλάξεων στον υποκινητή του γονιδίου TERT διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του καρκινώματος του θυρεοειδούς και ειδικότερα οι μεταλλάξεις TERT ταυτοποιούνται σε επιθετικά καρκινώματα. Έτσι, σε καλοήθεις όγκους δεν παρατηρούνται μεταλλάξεις, ενώ το ποσοστό ανέρχεται σε 12-14% στον θηλώδη και θυλακιώδη καρκίνο και στο 38-46% στον χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνο του θυρεοειδούς και στον αναπλαστικό καρκίνο (Liu et al., 2013). Στην παρούσα εργασία δεν περιλαμβάνονται χαμηλής διαφοροποίησης και αναπλαστικά καρκινώματα, και το ποσοστό των μεταλλάξεων του TERT εκτιμάται σε 3,5% για θηλώδη και 0% για θυλακιώδη καρκινώματα. Τα ποσοστά αυτά είναι μικρότερα από αυτά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, αλλά αυτό μπορεί να οφείλεται στον σχετικά μικρό αριθμό δειγμάτων που μελετήθηκαν. Σημαντικό εύρημα στην παρούσα μελέτη ήταν το γεγονός ότι στο καρκίνωμα που φέρει τη μετάλλαξη C228T ταυτοποιήθηκε και η

μετάλλαξη BRAFV600E. Ο συνδυασμός αυτών των μεταλλάξεων έχειδειχθεί ότι δρα συνεργιστικά και αυξάνει την επιθετικότητα του όγκου, με αποτέλεσμα σημαντική αύξηση των υποτροπών και της θνησιμότητας των ασθενών (Liu & Xing, 2016).

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία ανιχνεύτηκε η πιο συχνή μετάλλαξη στον υποκινητή του γονιδίου TERT σε καρκινώματα θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό, αλλά με πολύ χαμηλά ποσοστά. Εντούτοις, η μετάλλαξη του TERT που ανιχνεύθηκε συνυπάρχει και με άλλες μεταλλάξεις, ειδικότερα την πιο συχνή μετάλλαξη BRAF σε καρκινώματα που χαρακτηρίζονται από επιθετική συμπεριφορά. Η εργασία αυτή είναι μοναδική στον ελληνικό πληθυσμό, εντούτοις για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων είναι απαραίτητο η μελέτη να επεκταθεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adeniran A.J., Zhu Z., Gandhi M. et al. Correlation between genetic alternations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 30(2): 216-222, 2006.
- Altekruse S., Kosary C., Krapcho M., Neyman N., Aminou R., Waldron W. et al. (2010), "Seer cancer statistics Review", 1975-2007, National Cancer Institute. Bethesda, MD. http://seercancer.gov/csr/1975_2007, 2010.
- Ausubel F.M., Brent R, Kingston R.E., Moore D.D., J.G. Seidman, Smith J.A., Struhl K. "Current Protocols in Molecular Biology". John Wiley & Sons , 2003.
- Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA, MacConaill LE, Brandner B, Calicchio ML, Kuo FC, Ligon AH, Stevenson KE, Kehoe SM, Garraway LA, Hahn WC, Meyerson M, Fleming MD, Rollins BJ. "Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis". *Blood* 116(11) :1919-23, 2010.
- Ballester LY, Sarabla SF, Sayeed H, Patel N Baalwa J, Athanassaki I, Hernandez JA, Fang E, Quintanilla NM, Roy A et al. "Integrating molecular testing in the diagnosis and management of children with thyroid lesions". *Pediatric and Developmental Pathology*, 2015.
- Beahrs, H., Pasternak, B. M. "Cancer of the thyroid gland". *Curr. Probl. Surg.*, Dec.1969.
- Biese D., Gandolfi A, Raggazi M, Eszlinger M, Sancisi V, Gugnoni M, Visani M, Pession A, Casadei G, Durante C et al. "Tert promoter mutations in papillary thyroid microcarcinomas". *Thyroid* 25 :1013-1019, 2015.
- Blasco MA. "Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond". *Nature Review Genetics* 6 :611-622, 2005.
- Bojesen SE, Pooley KA, Johnatty SE, Beesley J, Michailidou K, Tyrer JP, Edwards SL, Pickett HA, Shen HC, Smart CE et al. "Multiple independent variants at the TERT locus are associated with telomere length and risks of breast and ovarian cancer". *Nature Genetics* 45 :371-384, 2013.
- Bos, Rehmann, Wittinghofer. "GEFs and GAPs: Critical elements in the control of small G proteins". *Cell Press*, volume 129 (5):865-877, 2007.
- Bryce LA, Morrison N, Hoare SF, Murir S, Keith WN. "Mapping of the gene for human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization in situ". *Neoplasia* 2 (3): 197-201, 2000.
- Cabanillas M.E., McFadden D.G., Durante C. "Thyroid cancer". *Seminars* :1-13, 2016.
- Caronia L.M., Phay J.E., Shah M.H. "Role of BRAF in thyroid oncogenesis". *Clinical cancer research* 17(24):7511-7, 2011.

Castro P, Redocho AP, Soares RJ, et al. "PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in follicular variant of papillary thyroid carcinoma". J Clin Endocrinol Metab 91(1):213-220, 2006.

Chen ZJ, Wu J, Li X, Ye C, Wenxing H. "Novel strategies to construct complex synthetic vectors to produce DNA molecular weight standards". Mol Biotechnol. 2: 128-133, 2009.

Cheung CC, Carydis B, Ezzat S, Bedard YC, Asa SL. "Analysis of ret/PTC gene rearrangements refines the fine needle aspiration diagnosis of thyroid cancer". J Clin Endocrinol Metab. 86(5):2187-2190, 2001

Codd V, Nelson CP, Albrecht E, Mangnino M, Deelen J, Buxton JL, Hottenga JJ, Fisher K, Esko T, Surraka I et al. " Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease". Nature Genetics 45 :422-427, 2013.

Cukusic A, Skrobot Vidacek N, Sopta M, Rubelj I. "Telomerase regulation at the crossroads of cell fate". Cytogenet. Genome Res. 122(3-4):263-272, 2008.

David A. Liebner, Manisha H. Shah. "Thyroid cancer: pathogenesis and targeted therapy". Ther Adv Endocrinol Metab 2(5):173-195, 2011.

Davies Louise, Welch H. Gilbert. "Increasing Incidence of Thyroid Cancer in the United States,1973-2002". JAMA 295(18) :2164-7, 2010.

Davies, Bignell, Cox, Stephens, Edkins, Clegg, Teague, Woffendin, Garnett et al. "Mutations of the BRAF gene in human cancer". Nature 417:949-954, 2002.

Delellis R.A., "Pathology and Genetics of Thyroid Carcinoma", Journal of Surgical Oncology 94 :662-669, 2006.

Denise Kirsten. "The thyroid gland: Physiology and Pathophysiology". Endocrine series #6 19(8):11-26, 2000.

Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, et al., Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors, J Clin Endocrinol Metab 88(9):4440-4445, 2003.

Fallahi, P., Miccoli, P., Antonelli, A., Basolo, F. Molecular diagnostics of fine-needle aspiration for the presurgical screening of thyroid nodules. Current Genomics, 15:171-177, 2014.

French CA, Alexander EK, Cibas ES, et al. Genetic and biological subgroups of low stage follicular thyroid cancer. Am J Pathol 162(4):1053-1060, 2003.

Filleti S, Durante C and Torlontano M. "Nonsurgical approaches to the management of thyroid nodules". Nature Clinical Practice Vol 2 No 7 :384-394, 2006.

Ghosh A, Saginc G, Leow SC, Khattar E, Shin EM, Yan TD, Wong M, Zhang Z, Li G, Sung WK et al. "Telomerase directly regulates NFκB-dependent transcription". *Nature Cell Biology* 14 :1270-1281, 2012.

Greider CW & Blackburn EH. "Tracking telomerase". *Cell* 116 : S83-S86, 2004.

Greider CW, Blackburn EH. "Telomeres, telomerase and cancer". *Sci Am* 2:92-97, 1996.

Guyton C.A., Hall J.E., "Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology, 13th Edition", PA : Elsevier/Saunders, 2016.

Hanahan D & Weinberg RA. "Hallmarks of cancer: the next generation". *Cell* 144 :646-674, 2011.

Hedinger C, Williams ED, Sobin LH. The WHO histological classification of thyroid tumors: A commentary on the second edition. *Cancer* 63 :908-911, 1989.

Horikawa I, Cable PL, Afshari C, Barret JC. "Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene". *Cancer Res.* 59(4):826-830, 1999.

Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, Kadel S, Moll I, Nagore E, Hemminki K et al. "Tert promoter mutations in familial and sporadic melanoma". *Science* 339 :959-961, 2013.

Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L & Garraway LA. "Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma". *Science* 339 :957-959, 2013.

Janknecht R. "On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells". *FEBS Letters* 564 :9-13, 2004.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL & Shay JW. "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer". *Science* 266 :2011-2015, 1994.

Kirsten D, "The thyroid gland: Physiology and Pathophysiology", *Endocrine Series #6 Vol.19* :11-25, 2000.

Koh CM, Khattar E, Leow SC, Liu CY, Muller J, Ang WX, Li Y, Franzoso G, Li S, Guccione E et al. "Telomerase regulates MYC-driven oncogenesis independent of its reverse transcriptase activity". *Journal of Clinical Investigation* 125 :2009-2122, 2015.

Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, et al. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 289(5483):1358-1360, 2000.

de Lange T. Telomere-related Genome Instability in Cancer. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 70(0), 197–204, 2005.

Leboulleux S, Baudin E, Travagli JP, Schlumberger M. "Medullary thyroid carcinoma". *Clinical Endocrinol* 61 :299-310, 2004.

Lee P.Y., Costumbrado J, Hsu C.Y., Kim Y.H. "Agarose Gel Electrophoresis for the separation of DNA fragments". *J Vis Exp* 62(e3923):1-5, 2012.

Lewin Benjamin. "Genes VIII". Pearson Education, Pearson Prentice Hall Upper Saddle River, NJ. 2004.

Liebner D.A. and Shah M.H. "Thyroid cancer: pathogenesis and targeted therapy". *Ther Adv Endocrinol Metab* 2(5) :173-195, 2011.

Liu X, Wu G, Shan Y, Hartman C, von Deimling A & Xing M. "Highly prevalent TERT promoter mutations in bladder cancer and glioblastoma". *Cell Cycle* 12 :1637-1638, 2013.

Liu X, Bishop J, Shan Y, Pai S, Liu D, Murugan AK, Sun H, El-Naggar AK & Xing M. "Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers". *Endocrine-Related Cancer* 20 :603-610, 2013.

Livolsi VA, Albores-Saavedra J, Asa SL, Baloch ZW, Sobrinho-Simoes M, Wenig B, Delellis RA, Cady B, Mazafferri EL, Hay I, Fagin JA et al. Papillary carcinoma. In : Delellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C editors. WHO classification tumors, pathology & genetics: Tumors of endocrine organs. Lyon: IARC Press :57-66, 2004.

Magdeldin S. "Gel Electrophoresis – Principles and Basics". InTech, 2012.

Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, et al. Expression of PAX8-PPARgamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 87(8):3947-3952, 2002.

Mazzaferri, Jhiang. "Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer". *Am J Med* 97 :418-28, 1995.

Mazzaferri, Young. "Papillary thyroid carcinoma: A 10 year follow up report of the impact of therapy in 576 patients". *Am J Med* 70 :511-8, 1981.

Molinaro E., Romei C., Biagini A., Sabini E., Agate L., Mazzeo S., Materazzi G., Sellari-Franceschini S., Rebenhini A., Torregrossa L., Basolo F., Vitti P. and Elisei R. "Anaplastic thyroid carcinoma: from clinicopathology to genetics and advanced therapies". *Nature* volume 13 :644-660, 2017.

Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL & Wu JR. "A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes". *PNAS* 85 :6622-6626, 1988.

Namba H, Rubin SA, Fagin JA. Point mutations of RAS oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 4(10): 1474-1479, 1990.

Nikiforov YE."Molecular Diagnostics of Thyroid Tumors". *Archive of Pathology & Laboratory Medicine* 135(5):569-577, 2011.

Nikiforov Y.E. "Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets". Modern Pathology 21 : S37-S43, 2008.

Nikiforova MN, Biddinger PW, Cadill CM, Kroll TG, Nikiforov YE. PAX8/PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analysis. Am J Surg Pathol 26(8):1016-1023, 2002.

Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW et al. RAS point mutations and PAX/PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 88(5):2318-2326, 2003.

Nikiforova MN, Nikiforov YE. "Molecular Diagnostics and Predictions in Thyroid Cancer". Thyroid Volume 19, Number 12 :1351-1361, 2009.

Ngeow J & Eng C. "TERT and BRAF in thyroid cancer: teaming up for trouble". Journal of Clinical Oncology 32 :2683-2684, 2014.

Ovalle W.K., Nahirney P.C. "Netter's Essential Histology, 2nd Edition", Philadelphia, PA : Elsevier/Saunders, 2013.

Poupak Fallahi, Riccardo Giannini, Paolo Miccoli, Alessandro Antonelli and Fulvio Basolo. "Molecular Diagnostics of fine needle aspiration for the Presurgical screening of Thyroid Nodules". Current Genomics 15 :171-177, 2014.

Rafnar T, Sulem P, Stacey SN, Geller F, Gudmundsson J, Sigurdsson A, Jakobsdottir M, Helgadóttir H, Thorlacius S, Aben KK et al. "Sequence variants at the TERT-CLPTM1L locus associate with many cancer types". Nature Genetics 41 :221-227, 2009.

Russell Peter J. "I – genetics. A Mendelian approach". Pearson Education, Inc. – Benjamin Cummings, 2009.

Santoro M, Carlomango F, Hay ID, Herrman MA, Grieco M, Melillo R, Pierotti MA, Bongarzone I, Della Porta G, Berger N, Peix JL, Paulin C, Fabien N, Vecchio G, Jenkins RB, Fusco A. Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. J Clin Invest (89):1517-1522, 1992.

Sak Sepil Dizbay. "Variants of papillary Thyroid Carcinoma: Multiple Faces of a Familiar Tumor". Turkish Journal of Pathology 31 :34-47, 2015.

Scopa. "Histopathology of thyroid tumors. An Overview". Hormones 3(2):100-110, 2004.

Sebastiano Filetti, Cosimo Durante, Massimo Torlontano. "Nonsurgical approaches to the management of thyroid nodules". Nature clinical practice, Endocrinology & Metabolism Vol2 No7, 2006.

Smith LL, Collier HA & Roberts JM. "Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation". Nature Cell Biology 5 :474-479, 2003.

van Steensel B & de Lange T. "Control of telomere length by human telomeric protein TRF1". *Nature* 385:740-743, 1997.

Tiedje V, Stuschke M, Weber F, Dralle H, Moss L, Führer D. "Anaplastic thyroid carcinoma: Review of treatment protocols". *Department of Endocrinology and Metabolism* :1-17, 2018.

Trimboli P, Giovanella L, Crescenzi A, Romanelli F, Valabrega S, Spriano G, Cremonini N, Gugliemi R, Papini E. "Medullary thyroid cancer diagnosis: An appraisal". *Wiley Online Library. Head and Neck* :1-7, 2013.

D. Voytas, "Agarose gel electrophoresis," in *Current Protocols in Molecular Biology*. JohnWiley & Sons, Inc., 2001.

Wang N, Xu D, Sofiadis A, Hog A, Vukojevic V, Backdahl M, Zedenius J & Larsson C. "Telomerase-dependent and independent telomere maintenance and its clinical implications in medullary thyroid carcinoma". *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99 :E1571-E1579, 2014.

Watson J.D., Caudy A.A., Myers R.M., Witkowski J.A. "Recobinant DNA (Genes and Genomes – a short course)". W. H. Freeman and Company, New York and Basingstoke, 3rd edition, pp.103 :126-135, 2007.

Wyatt HD, West SC & Beattie TL. "InTERTpreting telomerase structure and function". *Nucleic Acids Research* 38 :5609-5622, 2010.

Xing M. "Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer". *Nature Review Cancer* 13 :184-199, 2013.

Xing M, Liu R, Liu X, Murugan AK, Zhu G, Zeiger MA, Pai S & Bishop J. "BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively indentify the most aggressive papillary thyroid cancer with the highest recurrence". *Journal of Clinical Oncology* 32 :2718-2726, 2014.

Xing M. "BRAF mutation in thyroid cancer". *Endocr Relat Cancer* 12(2):245-262, 2005.

Yen et al. "Physiological and Molecular Basis of thyroid hormone action". *American Physiology society, Physiological reviews, USA* Vol 81 No 3, 2001.

Yuri E. Nikiforov. "Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets". *Modern Pathology* (2008) 21:37-43.

Zhu Z., Gandhi M., Nikiforova MN, Fisher AH, Nikiforov YE. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of RAS mutations. *Am J Surg Pathol.* 120(1): 71-77, 2003.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Κουτσάμπελας Κ.Χ., “Νοσήματα θυρεοειδούς: Διάγνωση – Θεραπεία”, εκδόσεις Πασχαλίδης Αθήνα, 1986.